

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 1 月 25 日 (25.01.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/05987 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/85, A01K 67/027 (74) 代理人: 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5 森ビル3階 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/02916
- (22) 国際出願日: 2000 年 5 月 2 日 (02.05.2000) (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願平11/200997 1999 年 7 月 14 日 (14.07.1999) JP (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社トランスジェニック (TRANSGENIC INC.) [JP/JP]; 〒862-0976 熊本県熊本市九品寺1丁目18番7号 Kumamoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山村研一 (YAMAMURA, Ken-ichi) [JP/JP], 荒木喜美 (ARAKI, Kimi) [JP/JP]; 〒862-0976 熊本県熊本市九品寺4-24-1 熊本大学発生医学研究センター内 Kumamoto (JP).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: TRAP VECTOR AND GENE TRAPPING METHOD BY USING THE SAME

(54) 発明の名称: トラップベクター及びこれを用いた遺伝子トラップ法

(57) Abstract: A trap vector containing a mutated loxP in which, in the loxP sequence consisting of a reverse repetitive sequence 1, and spacer sequence and a reverse repetitive sequence 2 in this order, a mutation is transferred into a part of the reverse repetitive sequence 1 or a part of the reverse repetitive sequence 2.

(57) 要約:

逆反復配列 1、スパーサー配列及び逆反復配列 2 の順で構成される loxP 配列のうち逆反復配列 1 の一部の配列又は逆反復配列 2 の一部の配列に変異が導入された変異型 loxP を含むトラップベクター。

WO 01/05987 A1

## 明 細 書

## トラップベクター及びこれを用いた遺伝子トラップ法

## 技術分野

本発明は、遺伝子トラップ法によるランダム変異 ES クローン技術に関する。

## 背景技術

ヒトゲノムプロジェクトの進展で、ヒトゲノムの構造解析は 2003 年又はそれ以前に終了すると言われている。したがって、個々に遺伝子を単離し、構造解析を行なう時代ではなく、ゲノムの「機能解析」の時代に入ったといえる。

しかし、ゲノムの塩基配列のみでは、機能に関する情報は十分でないため、機能解析のための新しい解析系が必要である。さらに、ヒトゲノム解析の一つの大きな目標はヒト疾患の原因遺伝子の解明であるが、原因遺伝子の構造だけでは病気を説明することはできない。また、ヒト患者を用いて実験することはできず、発症機構を解析することはできない。

したがって、原因遺伝子の同定後の発症過程の解析と新たな治療法の開発のためには、モデル個体の作製が必須課題となっている。

一方、ゲノムを、その構造から遺伝子部分とそれ以外の部分に分けるとすれば、それぞれ別個の機能を有すると考えられ、両者の機能を解析することが必要である(図 1)。ゲノム全体から見れば、個々の遺伝子は一部の機能しか果たしておらず、ゲノムは単に遺伝子の集合体ではなく、まだ知られていない機能を有しているとも考えられる。事実、position effect mutation という新しい概念が成立したことから、ゲノムには機能が未知の領域を有するものと推察される。

遺伝子部分については、調節領域とコード領域があるが、現在ゲノム機能解析の標的となっているのは、コード領域である。ヒトとマウスを比べてみても、遺伝子の種類はほぼ同じであるため、調節領域の機能解析は重要である。但し、ヒトの遺伝子とマウスの遺伝子との間には、種の相違がある。この違いは、タンパク質の違いではなく、遺伝子発現の調節の違いによるものと思われる。

発現調節にあずかる転写因子等の機能は、遺伝子のコード領域の配列から解明することができる。その転写因子が結合するエレメントの解析は、一つの遺伝子の調節領域内に多数存在するので、機能の解明は現在のところ極めて困難である。但し、機能解析の一手法として、細菌人工染色体を用いる方法等が考え得る。

コード領域の機能解析のレベル（対象）は、mRNA レベル、蛋白レベル、細胞レベル、組織・臓器レベル、個体レベルが考えられる。mRNA レベルは、DNA チップで対応できると考えられる。他方、mRNA 以外のレベルの解析を考えると、ES 細胞を利用するのが最も良い方法と思われる。なぜなら、ES 細胞から直接 *in vitro* で、各種細胞や組織の誘導系が開発されているものもあるし、今後開発され得る可能性のあるものも多いからである。また、個体レベルの解析系が樹立できる利点もあるためである。

上記から、ゲノムの機能解析を考える上でも、ES 細胞レベルでの遺伝子破壊とそのマウスの作製は極めて重要であることがわかる。

これまでは、ES 細胞を用いた相同遺伝子組換え法が、遺伝子破壊マウス作製において主役を演じていたが、これを個々の遺伝子破壊マウスを作製するという戦術としてではなく、網羅的に作製するという戦略的な立場からみたとき、大きな問題点がある。

第 1 は、時間がかかりすぎることである。遺伝子破壊マウス作製において、ES 細胞を用いた相同組換えによるノックアウト ES クローンを単離することが律速段階となっている。1 人の熟練した研究者でも、ノックアウト ES クローンを単離するには最低 3 ヶ月かかるので、年間 4 遺伝子を破壊できるにすぎない。従って、10 万個の遺伝子にそれぞれ一つの変異を導入する場合は、1 年あたり 25,000 人が必要とされる。現在世界中で、1 年間に約 1000 系統の遺伝子破壊マウスが作製されていると見積もられている。そうすると、ノックアウト ES クローンを 10 万種類作製するのに 100 年かかることになる。これでは、2003 年に終了するといわれているヒトゲノムの構造解析の進展と比較しても、現実的ではない。

第 2 は、コストがかかりすぎることである。1 系統の遺伝子破壊マウス作製のため、人件費及び減価償却費を除いても、最低 200～400 万円必要である。したがって、10 万個の単純な遺伝子破壊マウス作製だけで 2,000～4,000 億円必要とな

る。

以上のように、従来の ES 細胞を用いた相同遺伝子組換えには問題点があり、また、ゲノムは巨大ではあるが、数は決まっている。従って、この中から重要な機能を持つ遺伝子を単離することが必要となる。遺伝子の機能については、遺伝子破壊マウスを作製して初めて明らかになることが多いことから、遺伝子破壊マウスは将来画期的な薬剤の開発等にも直結し、極めて付加価値が高い。従って、「ランダム」かつ「大規模」にマウスの変異体作製を行なうのが世界の「戦略」となっており、現在のところ、以下に述べる 3 つの方法が、ランダム変異マウス作製において、もっとも妥当であると考えられている。

第 1 は、変異原物質であるエチルニトロソウレア (ethylnitrosourea:ENU) を用いる方法である。ENU を用いた方法による大規模な突然変異体作製のプロジェクトがヨーロッパで開始されている。ドイツではヒトゲノムプロジェクトの一貫として哺乳類遺伝学研究所のパリング博士を中心として 1997 年度に開始した。英国においてもスミスクライン社が資金を提供し、Harwell にある MRC のマウスゲノムセンターにおいてブラウン博士を中心として主に脳・神経系の突然変異マウスを樹立することを目的として開始している。現在までに、両者併せて、優性遺伝を示す変異マウスが約 200 系統樹立され、予想よりもよい効率でプロジェクトが進行している。米国においてもケースウエスタンリザーブ大学やオークリッジ国立研究所を中心として、膨大な予算 (年間 60 億円) でマウスゲノムの構造解析や ENU 法による変異体作製が始まることとなった。

ENU を成熟雄マウスに投与すると、減数分裂前の精原細胞に作用し、1 細胞当たり約 50-100 カ所に点突然変異をランダムに引き起こす。そして、1 つの遺伝子座につきおよそ 1/1,000/配偶子の頻度で突然変異が起こる。したがって、1 匹の処理マウスを雌マウスと交配することにより、F1 世代で多種類の変異マウスを作製できる。また、ENU を用いる方法は、特定の遺伝子座について 1,000 匹をスクリーニングすれば、1 匹はその遺伝子に変異が生じている確率となるため、極めて効率がよいと考えられている。

第 2 は、やはり変異原物質であるクロラムブシルを用いる方法である。この方法によれば、ENU 法と同じ頻度で精原細胞に突然変異を引き起こす。ただし、こ

の場合は時に 1 メガベースに及ぶ欠失変異が生じる。

第 3 は遺伝子トラップ法によるものである。遺伝子トラップ法とは、マーカー遺伝子を含むトラップベクターを ES 細胞に導入し、マーカー遺伝子の発現を指標として未知遺伝子の探索を行なうことを目的として開発された方法である。トラップベクターの組み込みはランダムであり、その組み込みにより、殆どの場合内在性遺伝子（本来、その細胞や組織に存在する遺伝子）は破壊される。したがって、その ES 細胞を用いてキメラマウスを作製することにより、種々の遺伝子破壊マウスを作製できる。

しかしながら、これら変異原物質を用いる方法及び遺伝子トラップ法は、それぞれ利点と欠点を有する（表 1）。

表 1

	ENU 法	クロラムブシル法	遺伝子トラップ法
変異の性質	点変異	欠失変異	自在の変異
変異マウス作製	容易	容易	困難
変異遺伝子同定	困難	中程度	容易
その他の特徴			ES トラップクローンの利用が可能

ENU 法は、変異マウスの作製は容易であるが、個々の変異系統の樹立は、交配により分離を行わなければならない。また、変異した遺伝子の同定には、まず多型 DNA マーカーを用いた連鎖解析により遺伝子座を同定し、その後にポジショナルクローニング法により遺伝子を単離しなければならない。従って、ENU 法は操作が煩雑である。

クロラムブシル法は、変異マウスの作製は容易であるが、欠失部位を同定しなければならず、そのためには多数の多型 DNA マーカーを用いて解析する必要がある。また、一般的に、クロラムブシル法などの変異原物質法では、大規模の飼育室を必要とするため、費用及び労力がかかる。

遺伝子トラップ法は、変異マウスの作製に手間と技術を要するが、変異遺伝子の同定は容易であり、飼育室の規模に応じて実験可能である。遺伝子トラップ ES クローンはそれ自体ゲノム機能解析のための貴重なリソースとなり、この点も他の方法と際立って異なる点である。

遺伝子トラップ法についても、世界のいくつかの研究室で変異体作製が始まっている。米国では、民間のレキシコンジェネティクス社がレトロウイルスベクターを用いた遺伝子トラップによるランダム破壊を行なっている。しかし、遺伝子をトラップできていても、内在性遺伝子を破壊できているかどうか定かでないこと、生殖キメラマウスが作製できるかどうか不明であること、キメラマウス作製は別料金を要求されること、利用するに当たって相当な金額を要求していることなどから、一般の研究者にとっては殆ど利用できない状況である。また、ドイツではENUプロジェクトの一貫としても 12,000 クローンを目標として遺伝子トラップが行なわれている。いずれにしても、マウス系統の樹立よりも、トラップした遺伝子の解析を先行させる方法で進められている。

#### 発明の開示

本発明が解決しようとする課題は、従来の遺伝子トラップ法の問題点を克服し、ほぼ理想的と思われる新規の「可変型遺伝子トラップ法」を開発し、この方法を用いて大規模な ES トラップクロンの樹立とそれを用いたマウス変異体作製を行なうことにある。従って、本発明は、本発明は、トラップベクター、遺伝子トラップ法、トラップされた遺伝子が導入されたトランスジェニック又はノックアウト動物、さらにトラップされた遺伝子を提供することを目的とする。

本発明者は上記課題を解決するために鋭意研究の結果、遺伝子トラップ法にバクテリオファージ由来の組換えシステムである、Cre-loxP を利用することを思い付き、本発明を完成するに至ったものである。ここで Cre は組換え酵素であり、loxP 配列を認識して、この部位で組換えを起こすものである。

すなわち、本願は、以下の発明を提供する。

(I) 逆反復配列 1、スペーサー配列及び逆反復配列 2 の順で構成される loxP 配列のうち、逆反復配列 1 の一部の配列又は逆反復配列 2 の一部の配列に変異が導入された変異型 loxP を含むトラップベクター。

ここで、逆反復配列 1 の一部の配列に変異が導入されたものとしては lox71 (例えば配列番号 1 に示されるもの) が挙げられ、逆反復配列 2 の一部の配列に変異が導入されたものとしては lox66 (例えば配列番号 2 に示されるもの) が挙げら



れる。

(2) 逆反復配列 1 の一部の配列に変異が導入されたトラップベクターと逆反復配列 2 の一部の配列に変異が導入されたトラップベクターとが組換えを起こしたベクター。

(3) 以下の (a) ~ (i) のトラップベクター。

(a) SP-SA-lox71-IRES-M-loxP-PV-SP

(b) SP-lox71-IRES-M-loxP-PV-SP

(c) SA-lox71-IRES-M-loxP-pA-PV-SP

(d) SA-lox71-IRES-M-loxP-puro-pA-PV-SP

(e) lox71-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511

(f) lox71-IRES-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511

(g) (lox71 が組み込まれた SA) -M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511

(h) (lox71 が組み込まれた SA) -IRES-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511

(i) (lox71 が組み込まれた SA) -M-loxP-pA-lox2272-プロモーター-M-lox511-SD

(SP は任意配列を、SA はスプライスアクセプターを、SD はスプライスドナーを、IRES は分子内リボゾームエントリー部位を、M はマーカー遺伝子を、puro はピューロマイシン耐性遺伝子を、pA はポリ A 配列を、PV はプラスミドベクターを表す。)

上記 (a) ~ (i) のトラップベクターにおいて、マーカー遺伝子としては  $\beta$ -geo 遺伝子が挙げられ、プラスミドベクターとしては、pBR322、pUC (pUC18、pUC19、pUC118、pUC119 等)、pSP (pSP64、pSP65、pSP73 等)、pGEM (pGEM-3、pGEM-4、pGEM-3Z 等) が挙げられる。

(4) 前記いずれかのトラップベクターを胚幹細胞に導入することを特徴とする遺伝子トラップ方法、及び該方法によりトラップベクターが導入された胚幹細胞。

(5) 前記胚幹細胞を動物に導入することを特徴とするトランスジェニック動物又はノックアウト動物の作製方法、及び該方法により作製されたトランスジェニック動物又はノックアウト動物。

上記動物としては、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ブタ、ヒツジ及びヤギからなる群から選択されるいずれか 1 種が挙げられる。

以下、本発明を詳細に説明する。本明細書は、本願の優先権の基礎である日本

国平成11年特許出願第200997号の明細書及び/又は図面に記載される内容を包含する。

本発明は、遺伝子トラップ法、トラップされた遺伝子が導入されたトランスジェニック又はノックアウト動物、さらにトラップされた遺伝子に関するものである。本発明のトラップ法の概要を図2に示す。まず、本発明の目的を達成するためトラップベクターを構築し、これをES細胞に導入してトラップクローンを単離及び選択する(図2A~C)。図2ではpU-Hachiトラップベクターを例示する。その後、キメラ動物(例えばキメラマウス)を作製してトラップクローン由来のマウスを作製する(図2F~G)。一方、単離及び選択されたトラップクローンを用いて、トラップされた遺伝子の単離及び配列決定、並びにプラスミドレスキューによるゲノムの回収を行う(図2C~E)。さらに、クローンを電気穿孔法及びピューロマイシン等の薬剤選択を行い、トラップされた遺伝子を発現させ、ESクローンのマウス系列の作製を行う(図2H~I)。

本発明をまとめると以下の通り要約できる(パイロットスタディを含む)。

#### (I) 全体の効率

##### (I-1) 胚様体形成によるスクリーニング

ネオ耐性クローン106個を浮遊培養し、胚様体を形成させ、ES細胞の段階及び分化誘導後の2点でb-galの発現を解析した。その結果、90個(86%)のトラップクローンは、いずれかの時期で発現していた。

##### (I-2) 単一コピーの組込みを示すクローンの選別

胚様体形成過程での遺伝子発現を示した109個のトラップクローンについて、DNAを抽出し挿入パターンを解析した。その結果、75個(70%)は単一コピーの挿入であり、そのうち完全なもの(プラスミド起源を保持するもの)が24個(22%)、pUC部分が欠失したものが40個(37%)であった。pUCが欠失しても、lox71部位を利用すればpUCは再び挿入できるので、これら64個(59%)のクローンについて利用できることが分かった(表4)。

##### (I-3) 生殖キメラ作製効率

上記のトラップクローンを用いてキメラマウスを作製したが、約半数のクローンにおいて生殖キメラマウスが得られた。

## (1-4) 全体の要約

最初に選択したネオ耐性クローンの約 26%のものが最終段階にまで至ることが分かった。生殖キメラ作製効率は現在上昇しているので、もう少し全体の効率をあげることができると考えられるが、現時点でも十分研究の実施には差し支えないほどのよい効率であると考えられる。

## (2) 遺伝子トラップ法の効率

これまでの試験の結果、24 トラップ系統を樹立した。遺伝子レベルの解析まで進んだものは 13 系統であり、塩基配列を Blast program を用いて Genbank および EMBL データベースと比較した。その結果、9 クローンが既知遺伝子、3 クローンは EST、残り 1 クローンは未知遺伝子であった (表 2)。これまで他の研究者による報告では、10-25%が既知遺伝子、10-20%が EST、50-80%が未知遺伝子、2-10%がリピートである。

表 2

	既知遺伝子	EST	未知遺伝子	リピート
本発明	9 (69. 2%)	3 (23. 1%)	1 (7. 7%)	
既報	10-25%	10-20%	50-80%	2-10%

## (3) トラップされた遺伝子

胚様体形成によるスクリーニング法にまり、発生や細胞増殖に関連する遺伝子を効率よくトラップしているかどうかを、既知遺伝子の種類を調べることで検討した。その結果、転写因子である CBP (CREB binding protein) や Spl、細胞周期に関与する cyclin B2、シグナル伝達に関与する Crk と p135-2、翻訳に関与する rRNA、snRNP L、RNA polymerase I、そしてミトコンドリア DNA であった (表 3)。それぞれよく知られた遺伝子がトラップされていることが分かった。これらの多くは、細胞増殖に関与する遺伝子であり、胚様体形成によるスクリーニング系が、よく機能していることを示唆している。

表 3

クラス	クローン番号	遺伝子
1. 核		
(1) 転写	Ayu3-112	CBP
	Ayu8-038	Sp1
(2) 細胞周期	Ayu3-008	Cyclin B2
	Ayu6-003	大腸菌の細胞分裂タンパクである Ftsj1に相同
(3) シグナル伝達	Ayu8-104	Crk
	Ayu8-025	pHPS <sub>1</sub> -2
(4) 細胞骨格	Ayu8-003	dynamamin II
2. 細胞質		
(1) 翻訳	Ayu3-022	rRNA
	Ayu8-016	sul1
	Ayu8-016	hnRNP Lの上流
	Ayu8-019	RNA polymerase Iの可能性大
(2) その他	Ayu3-001	ミトコンドリアDNA
3. 未知	Ayu7-003	不明

#### (4) トラップによる遺伝子破壊の確認

遺伝子トラップにより、実際に内在性遺伝子が破壊されるかどうか重要なポイントの一つであるので、6つの既知遺伝子について、トラップ部位の構造を解析した。その結果、1つはプロモーター領域、1つはエクソン内に、4つはイントロン内に挿入されており、すべてにおいて遺伝子が完全または部分的に破壊されていた。したがって、本発明の遺伝子トラップ法により、効率よく内在性遺伝子を破壊できることが明らかとなった(図10)。

以下、本発明をさらに詳しく説明する。

#### 1. トラップベクターの構築

遺伝子トラップ法とは、トラップベクターをES細胞に導入すると、偶然及びランダムにマウス内在性遺伝子に組込まれることを利用して、未知遺伝子をゲノム上でトラップするというものである。「遺伝子トラップ」とは、トラップベクターがゲノム上の特定の遺伝子に入り込んで、当該特定の遺伝子を捕まえることを意味し、遺伝子を捕らえるためのベクターを「トラップベクター」という。遺伝子にはエンハンサー、プロモーター、エクソン、ポリAなどが存在し、それぞれを

捕獲することができるが、そのためには、目的に応じた構造を持つトラップベクターを使用することができる。

一般に、エクソントラップベクターは、スプライスアクセプターのみを有するレポーター遺伝子、薬剤選択マーカー遺伝子、及びプラスミド部分から構成されており、マウス内在性遺伝子の下流に組み込まれたときにのみ、レポーター遺伝子が発現する。換言すれば、トラップベクター中のレポーター遺伝子の発現をモニターすることで、内在性遺伝子への組込みを知ることができる。また、pUC19などのプラスミドをトラップベクターに連結しておくこと、いわゆるプラスミドレスキュー法と呼ばれる手法により、トラップした内在性遺伝子を単離することができる。「プラスミドレスキュー法」とは、エレクトロポレーション法等により形質転換された細胞をアンピシリン選別等にかけて目的の遺伝子を回収する方法である（図 2E）。しかも、トラップ時にその遺伝子を破壊するので直ちに遺伝子破壊マウスを作製することができる。さらに、レポーター遺伝子はマウス内在性遺伝子の発現調節領域に支配されて発現するので、内在性遺伝子の発現の組織特異性、時期特異性を簡単に解析することができる。

従来の遺伝子トラップ法では、遺伝子を完全に破壊できても、ヒト遺伝病で見られるような小さな変異、例えば 1 アミノ酸置換といった変異を導入することができず、またヒト遺伝子と置換することもできないという問題点があった。そこで、本発明は、これらの問題点を解消するため、バクテリオファージ由来の組換えシステムである、Cre-loxP を改変し、それを遺伝子トラップ法に利用することにより、一旦遺伝子トラップベクターを組み込ませてマウス遺伝子を破壊した後、トラップベクター内の変異 lox 部位に、任意の遺伝子を挿入できることとしたものである。これによって、ヒト遺伝病で見られるような小さな変異、例えば 1 アミノ酸置換といった変異を導入することが可能となり、またヒト遺伝子と置換することも可能となる。本発明のトラップベクターは、種々の遺伝子をトラップするために使用することができるが、エクソントラップ又はプロモータートラップ用として好ましく使用することができる。

loxP (locus of crossing (X-ring) over, Pl) は 34 塩基 (5'-ataacttcgtatagcatacat tatacgaagttat-3') からなる配列であり (配列番号 3)、5' 末端から 13

塩基 (逆反復配列 1 という)、及び 3' 末端から 13 塩基の配列 (逆反復配列 2 という) が、それぞれ逆反復配列を構成し、「gcatacat」により示される 8 塩基のスペーサーと呼ばれる配列が上記逆反復配列 1 及び 2 に挟まれている (図 3)。「逆反復配列」とは、スペーサーを境界として一方の側の配列が、他方の側の配列と、互いに向き合う方向に相補的であるような配列を意味する。換言すれば、一方の側の配列のうちセンス鎖の配列が、他方の側の配列のアンチセンス鎖と、互いに向き合う方向に相同であることを意味する。方向が互いに向き合っており、二本鎖を形成したときの配列自体は同一で繰り返されているため、逆反復配列と呼ばれる。図 3 に示す通り、二本鎖のうち一方の鎖 (例えばセンス鎖) において、紙面左側の逆反復配列 1 (5'-ataacttcgtata-3' : 配列番号 4) は、紙面右側の逆反復配列 2 (5'-tatacgaagttat-3' : 配列番号 5) に対し、それぞれ、5' → 3' 方向、3' ← 5' 方向に相補的という関係になっている。

loxP は、通常の配列と異なり方向性を有する。従って、本発明において、上記 5' → 3' の向きで loxP の配列を表示するときは、その表示中に紙面左向きの矢印 (例えば「←」) を含めることとする。

Cre (causes recombination) とは、遺伝子組換えを起こさせる組換え酵素 (リコンビナーゼともいう) を意味し、上記反復配列を認識し、スペーサー部の「cataca」を粘着末端とする切断様式で切断する (図 3)。

ところで、バクテリアの中では、2 カ所の loxP 間で組換えが起こり、挿入または削除反応が起こる。哺乳類細胞で挿入反応を起こすことができれば、後に任意の遺伝子を挿入できるので、応用性は格段に広がる。哺乳類細胞では核が大きいので、一旦削除された loxP を持つ環状 DNA は拡散してしまい、挿入反応は殆ど観察されない。

そこで、本発明者は、挿入反応を起こすために loxP 配列に変異を導入し、一旦遺伝子がゲノムに挿入されると挿入された遺伝子は削除できない (ゲノムから脱離しない) ようにすることを考え、このため 2 種類の変異型 loxP を準備した (図 4)。

1 つは、loxP の反復配列 (センス鎖側) のうち紙面左側の反復配列 (ATAACTTCGTATA) の左から 5 塩基までを、「TACCGTTTCGTATA」となるように置換変

異(下線部が変異させた部分。)を導入したものであり、これを「lox71」と名付けた(配列番号1;図4b)。もう1つは、紙面右側の反復配列(TATACGAAGTTAT)を、右から5塩基まで「TATACGAACGGTA」(下線部が変異させた部分。)となるように置換変異を導入したもので、これを「lox66」と名付けた(配列番号2;図4b)。

ゲノム上のlox71とプラスミド上のlox66との間で組換えが起こると、挿入されたDNAの5'側(紙面左側)にはloxPの両側の反復配列が変異したもの(「lox71/66」という:TACCGTTTCGTATA GCATACAT TATACGAACGGTA:配列番号6)が、右側には野生型のloxP(ATAACTTCGTATA GCATACAT TATACGAAGTTAT:配列番号3)が配置される(図4a)。その結果、Creはもはやlox71/66を見分けることができず、loxPとの間で組換えを起こせず、ゲノムに遺伝子は挿入されたままとなる。すなわち、loxP同士の相同組換えの場合は、切り出されたloxPを含む環状DNAが物理的に離れるので、挿入よりも削除に反応は傾く。一方、染色体側にlox71を、及び環状DNA側にlox66を用いると、組み込まれたときに生ずるlox71/66をCreリコンビナーゼは認識できにくくなり、削除反応より挿入反応に傾くため、挿入状態が維持される(図5)。ここで、本発明においては、染色体側にlox66を、環状DNA側にlox71を用いることもできる。

実際に、ES細胞にあらかじめlox71などの変異型loxP(以下「変異型lox」ともいう)を組込んでおき、そこに他の変異型loxP(例えばlox66)を含むプラスミドを導入すると、プラスミドがゲノムに組込まれる。したがって、例えばこのlox71をあらかじめ遺伝子トラップベクターに組込んでおけば、あとでいかなる遺伝子でもlox66を用いて挿入することが可能となる。つまり、小さな変異を導入した遺伝子やヒトの遺伝子で置換することも可能となった。

この変異型lox(lox71又はlox66)を利用した遺伝子トラップベクターは、以下の通り構築することができる(図6参照)。但し、以下のトラップベクターは例示であって、限定されるものではない。従って、以下のベクターにおいて、変異型loxとしてlox71を例示するが、これに限定されるものではなく、lox71の代わりにlox66を用いたものも、本発明のトラップベクターに含まれる。

(a) U8: SP-SA-lox71-IRES-M-pA-loxP-PV-SP

(b) U8delta: SP-lox71-IRES-M-pA-loxP-PV-SP

- (c) pU-Hachi: SA-lox71-IRES-M-loxP-pA-PV-SP
- (d) pU-12: SA-lox71-IRES-M-loxP-puro-pA-PV-SP
- (e) pU-15: lox71-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511
- (f) pU-16: lox71-IRES-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511
- (g) pU-17: (lox71 が組み込まれた SA) -M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511
- (h) pU-18: (lox71 が組み込まれた SA) -IRES-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511
- (i) (lox71 が組み込まれた SA) -M-loxP-pA-lox2272-プロモーター-M-lox511-SD

上記ベクターの構成要素において、SP は任意配列を、SA はスプライスアクセプターを、SD はスプライスドナーを、IRES は分子内リボソームエントリー部位を、M はマーカー遺伝子を、puro はピューロマイシン (puromycin) 耐性遺伝子を、pA はポリ A 配列を、PV はプラスミドベクターを表す。

トラップベクターがゲノム DNA に組み込まれる際に、ほとんどのケースでベクターの一部が欠失し、その結果、ベクターの重要な部分が欠失する場合がある。SP は、そのような欠失を防ぐためのダミーとして付加した任意配列であり、配列は自由に決定することができる。SP の配列の長さは 100~1000 塩基、好ましくは 300~400 塩基である。また、公知の任意配列を SP に使用することができる。公知配列としては、例えばウサギ  $\beta$ -グロビン遺伝子の一部等が挙げられる。

スプライスアクセプターは、スプライシングの際にエキソンの 3' 末端側に連結することができる配列を意味する。

スプライスドナーは、スプライシングの際にエキソンの 5' 末端側に連結することができる配列を意味する。

IRES は、分子内リボソームエントリー部位 (internal ribosomal entry site) と呼ばれ、タンパク質合成の際にアミノアシル t-RNA が結合するリボソーム上の部位 (A 部位) であり、CAP 非依存的に翻訳を開始できるようにするための配列である。

マーカー遺伝子は、本発明のベクターが標的遺伝子をトラップできたか否かを示すマーカーとなる遺伝子であり、大腸菌由来の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ 遺伝子)、又は lacZ 遺伝子とネオマイシン (G418) 耐性遺伝子との融合遺伝子 ( $\beta$ -geo 遺伝子)、CAT 遺伝子、GFP 遺伝子、SV40 ラージ T 遺伝子、ネオマイ



シン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ブラストサイジン S 耐性遺伝子等が挙げられる。

プラスミドベクターは、遺伝子トラップ後に内在性遺伝子をプラスミドレスキュー法により単離するために使用されるものである。「プラスミドレスキュー法」とは、トラップベクター内のプラスミド（大腸菌で増やせるもの）の一部を利用して当該プラスミド部分の近接領域を回収する方法を意味する。例えば、プラスミドにゲノム DNA が連結された場合において、制限酵素処理によりプラスミドとゲノム DNA とが連結した断片を切り出し、切り出した断片を環状にした後、大腸菌に導入して増殖させると、プラスミドに近接したゲノム DNA を回収することができる。プラスミドベクターとしては、例えば pBR322、pUC (pUC18、pUC19、pUC118、pUC119 等)、pSP (pSP64、pSP65 等)、pGEM (pGEM-3、pGEM-4、pGEM-3Z 等) 等が挙げられる。なお、プラスミドベクターには、supF、アンピシリン耐性遺伝子、複製開始点、及びクローニングのための制限酵素部位（例えばマルチクローニング部位）を単独で又は適宜組み合わせで連結しておくことができる。

上記 (a) に示すベクターを U8 という。U8 の基本部分 (SA-IRES- $\beta$ -geo-pA : 図 7) は、pGT1.8IRESbetageo に由来している。この pGT1.8IRESbetageo は、マウス En-2 遺伝子由来のスプライスアクセプター、IRES、 $\beta$ -geo を含んでいる。この pGT1.8IRESbetageo の BglII 部位に lox71 を組み込んだ後、SalI で処理し、SalI 断片を用意しておく。一方、pUC19 などのベクターに 180 塩基対の SP 配列、loxP、ポリ A シグナルを組み込み、プラスミド pEBN-Seti を作製する。このプラスミドの SalI 部位に、上記の SalI 断片を挿入し、U8 を作製する。したがって、この構造は、5' 側から順に任意配列、スプライスアクセプター、lox71、IRES、 $\beta$ -geo、pA、loxP、pUC19、任意配列である (図 7)。

上記 (b) に示すベクターを U8delta という。U8delta は、U8 のスプライスアクセプターを削除したベクターである。このベクターは、lox71 がレポーターである  $\beta$ -geo の前に、loxP が  $\beta$ -geo の後ろに接続された構成となっている。このような構成としたのは、ベクターが組込まれたのちに、Cre を一過性に発現させることで、中間の IRES と  $\beta$ -geo 部分を完全に除去できるからである。その結果、プラスミド pUC19 が上流に存在するマウス内在性遺伝子の近傍に位置することにな

り、マウス内在性遺伝子を容易に単離することができる。

上記(c)に示すベクターを「pU-Hachi」という。このベクターは、SA-lox71-IRES-M-loxP-pA-PV-SPで構成されている。pU-HachiベクターはpGT1.8IRES $\beta$ -geoに由来し、マウスEn-2遺伝子からのSA配列と、脳心筋炎ウイルス由来のIRES配列に連結した $\beta$ -geo配列とを含有する。lox71のBamHI断片をpGT1.8IRES $\beta$ -geoのBglII部位に挿入し、任意配列、loxP配列、及びマウスホスホグリセレートキナーゼ-1(PGK)由来のpoly A付加シグナルを、ベクターのLacZ配列が除去された改変型ベクターに挿入することによりプラスミドを構築する。SP配列は、トラップベクターの3'側を保護するために使用される。プラスミドの制限酵素SalI部位にSA-IRES-lox71- $\beta$ -geoのSalI断片を挿入することにより、pU-Hachiを得ることができる。

上記(d)に示すベクターを「pU-12」という。このベクターは、SA-lox71-IRES-M-loxP-puro-pA-PV-SPで構成されている。pU12トラップベクターを構築するために、まずpE3NSE7のPGK poly(A)シグナルをピューロマイシン耐性遺伝子+PGK poly(A)シグナルに置き換え、さらにその下流のBglII部位にlox511を挿入する。得られるプラスミドの制限酵素部位にpU-HachiからのSA-IRES-lox71- $\beta$ -geoのSalI断片を挿入することにより、pU-12を得ることができる。

上記(e)に示すベクターを「pU-15」という。このベクターは、lox71-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511で構成されている。ここで、「lox2272」は、loxPのスペーサー領域(gcatacat)のうち、第2番目のcをgに、第7番目のaをtに置換した配列(ggatactt)を有するものをいう。また、「lox511」は、loxPのスペーサー領域(gcatacat)のうち、第2番目のcをtに置換した配列(gtatacat)を有するものをいう。lox511及びlox2272は、loxP配列のスペーサー部分に変異があるため、それ自身(lox511同士、lox2272同士)とは組換えを起こすが、loxPやlox71とは組換えを起こさない変異lox配列である。なお、lox2272及びlox511の配列順序はどちらを前方又は後方にしてもよく、任意に選択することができる(以下同様)。

上記(f)に示すベクターを「pU-16」という。このベクターは、lox71-IRES-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511で構成されており、pU-15のlox71と $\beta$ -geoとの間

に IRES を挿入することにより作製することができる。

上記 (g) に示すベクターを「pU-17」という。このベクターにおいて、lox71 は SA の一部の領域に挿入されている。例えば、pSP プラスミドに、lox511、loxP、PGK poly (A) シグナル、lox2272 を挿入してプラスミドを構築し、次に、pU-Hachi の SA 内に lox71 配列を挿入し、続いて  $\beta$ -geo をこの順に挿入する。このプラスミドを、先に構築しておいたプラスミドと連結することにより、pU-17 を得ることができる。

上記 (h) に示すベクターを「pU-18」という。このベクターも、pU-17 と同様、SA の中に lox71 が挿入されている。pU-18 は、pU-17 の SA と  $\beta$ -geo との間に IRES を挿入することにより得ることができる。

上記 (i) に示すベクターは、(lox71 が組み込まれた SA) -M-loxP-pA-lox2272-プロモーター-M-lox511-SD で構成される。このベクターは、pU-17 内の PV の代わりに プロモーター及び M をこの順で挿入し、lox511 の後方に SD を連結することにより得ることができる。このベクターには、プロモーターが付加されている。プロモーターとしては、特に限定されるものではなく、任意のものを使用することができる。例えば、後述の形質転換体作製の項に記載の細菌由来プロモーター、酵母由来プロモーターなどのほか、SP6 RNA ポリメラーゼプロモーター、T7RNA ポリメラーゼプロモーター、T3RNA ポリメラーゼプロモーターなどの RNA ポリメラーゼプロモーター、あるいは、EF1 (伸長因子 1) プロモーター、PGK (グリセリン酸キナーゼ) プロモーター、MC1 (ポリオーマエンハンサー/単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ) プロモーターなどの哺乳動物由来プロモーターを例示することができる。

## 2. 遺伝子トラップ

前記の通り作製されたベクターを用い、2 段階の遺伝子トラップを行う。

第 1 段階は通常の遺伝子トラップ法である。「通常の遺伝子トラップ」とは、ES 細胞に前記トラップベクターを導入し、ES 細胞内に本来的に存在する内在性遺伝子をトラップすることを意味する。これにより、ES 細胞中の内在性遺伝子は破壊される。なお、この ES 細胞を用いて、後述の遺伝子破壊マウスを作製することが

できる。そして、トラップされた内在性遺伝子（図8、遺伝子 X）を単離した後に、大腸菌の中で部位特異的変異導入法等の方法でこの遺伝子に微細な変異を導入し（図8、遺伝子 X'）、これをプラスミド上で lox66 の下流につなぎ、第2段階の遺伝子トラップを行う（図8）。なお、遺伝子 X に変異を導入するには、Kunkel 法、Gapped duplex 法等の公知の手法又はこれに準ずる方法を採用することができる。例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット（例えば Mutant-K 又は Mutant-G (TAKARA 社製)）などを用いて、あるいは、LA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキット（TAKARA 社）を用いて変異の導入が行われる。

第2段階の遺伝子トラップは、lox66 の下流に連結された内在性遺伝子の変異型（遺伝子 X'）を ES 細胞に導入することを意味する。これにより、第1段階で導入されたトラップベクターの lox71 部位が、第2段階で導入したベクターの lox66 との間で組換えを起こし、「(lox71/66) - (遺伝子 X') - (loxP)」で構成されるカセットを含む改変した遺伝子を導入できる（図8）。

この方法によれば、改変した内在性遺伝子のみならず、ヒト遺伝子で置換することも可能であり、あらゆる遺伝子を導入することができる。これを本発明において可変型遺伝子トラップ法と名付ける。

### 3. トラップベクターが組み込まれたクローン（ES 細胞）のスクリーニング

遺伝子トラップベクターを ES 細胞に導入しネオ耐性クローンを選別すれば、これらはマウス内在性遺伝子の下流にトラップベクターが組み込まれているクローンであるとみなされる。これらのクローンから DNA を抽出し、サザンブロット法等により解析し、トラップベクターが1コピーのみ組み込まれているクローンを選択する。この選択方法を用いることにより、効率良くマウス遺伝子をトラップしているクローンを選択できることがわかったので、これをスクリーニング系として用いる。

#### (1) ネオ耐性クローンの単離

本発明において、トラップベクターを ES 細胞に導入するには、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法等が採用される。例えば、トラップベクター100  $\mu$ g を電気穿孔法（バイオラッド GenePulser を用い、800V, 3  $\mu$ F の条件

下)にて0.8mlのリン酸緩衝液中に浮遊させた3000万個のTT2 ES細胞に導入し、200  $\mu$ g/mlの濃度のG418存在下で培養する。1週間後に、ネオ耐性クローンを単離する。

遺伝子トラップベクターはES細胞のゲノム上にランダムに組み込まれる。したがって、単にトラップベクターをES細胞に導入しただけでは、必ずしも遺伝子の中に組み込まれるわけではなく、遺伝子とは関係のない場所にも組み込まれる。しかし、トラップベクター内には薬剤耐性遺伝子であるネオ耐性遺伝子がまれているので、それが発現している細胞は、ネオマイシン(G418ともいう)耐性となる。逆に言えば、ネオマイシン存在下で生存する細胞は、ネオ耐性遺伝子を発現していることになる。トラップベクター内のネオ耐性遺伝子は、ES細胞で発現しているマウスの遺伝子の下流に組み込まれないと発現しない。したがって、発現するということは、ある遺伝子の下流に組み込まれたことを意味する。

## (2) 組み込みパターンによるESクローンの選別

ESクローンから常法にしたがってDNAを抽出し、サザンブロット法等により組み込みパターンを解析する。サザンブロットのパターンが単一バンドとして現れた場合は、1コピーのみが組み込まれていると判断できるため、そのパターンを表したDNAを選別する。これは、プラスミドによるマウス内在性遺伝子の単離を容易に行なえるクローンを選別するためであり、また、1コピーでネオ耐性となるクローンでは、実際にマウス遺伝子をトラップしている確率が極めて高いからである。

## 4. キメラ動物作製によるトラップ系統(トランスジェニック動物)の樹立

キメラ動物の作製は標準的な方法で行う(図9)。本発明において作製されるキメラ動物の種類は特に限定されるものではない。例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、イヌ等が挙げられる。本発明においては、取り扱いが容易で繁殖もしやすいマウスが好ましい。

ネオマイシンで選別したES細胞を動物由来の桑実胚と凝集させ(ES細胞と桑実胚との集合体を形成させること)、キメラ動物胚(例えば胚盤胞まで発生したも

の)を作製する。これらを不妊雄と交尾し偽妊娠状態となった仮親の子宮に移植する。例えばマウスの場合は約 17 日後に子が生まれるので、仮親から生まれた子のうちキメラ動物を選ぶ。キメラの寄与率が高い動物は、生殖系列の可能性が高いが、キメラ動物を正常動物と交配することにより、生殖系列のキメラ動物であることの確認が可能である。

その後正常な雌と交配し、F1 を得て変異動物系統を樹立する。系統（トランスジェニック動物）樹立ができたもののみについて以下の解析を行なう。なお、F1 からの精子、及び該精子を用いて体外受精を行なって得られる 2 細胞期胚は、超急速凍結法にて凍結保存しておくことができる。

#### (1) 発現パターンの解析

F1 動物を交配し、胚（例えばマウスの場合 9.5 日目のもの）と成体における発現パターンを解析する。

#### (2) 表現型の解析

樹立した動物系統について、ヘテロ及びホモ動物の表現型を解析する。表現型の解析は、肉眼的観察、解剖による内部の観察、各臓器の組織切片、X 線撮影による骨格系、行動や記憶、血液を用いて行う。

#### (3) トラップした遺伝子の単離と構造解析、染色体地図の作成

トラップクローンから DNA の単離と塩基配列の決定を行ない（後述）、ホモロジーサーチを行なう。その結果、得られた配列情報が既知遺伝子、EST、未知遺伝子及びリピートのいずれに属するのか、区別しておく。EST と未知遺伝子については、染色体地図を作成することもできる。染色体地図は、蛍光 *in situ* hybridization (FISH) 法、またはマイクロサテライトプローブ等を用いた連関解析若しくは放射線照射による雑種細胞を用いた解析によって行なう。染色体上の位置が明らかになれば、既存の変異マウスの位置と対比し、一致するかどうかを調べておく。

#### (4) データベース構築

樹立した各系統について、マーカー遺伝子の胚（例えばマウスの場合 10 日目の胚）と成体における発現パターン、F1 および F2 動物における表現型、トラップした動物内在性 DNA の塩基配列、EST と未知遺伝子についてはその染色体上の位

置について、データベースを作成する。

## 5. ノックアウト動物

本発明のノックアウト動物は、遺伝子の機能が失われるように処理されたものである。その処理方法について説明する。

本発明において使用し得る動物としては、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、イヌ等が挙げられる。本発明においては、取り扱いが容易で繁殖もしやすいマウスが好ましい。

未知遺伝子を含むゲノム DNA を、動物 ES 細胞から調製したゲノム DNA から PCR により、又はゲノムライブラリーから得、これに本発明のトラップベクターに組み込む。この操作により、このエクソンの機能は破壊される。これと同時にベクターの中にネガティブ選別用のチミジンキナーゼ (tk) 遺伝子又はジフテリア (DT) 毒素遺伝子を繋げておく。エレクトロポレーション等によりトラップベクターを ES 細胞に導入し、この細胞をポジティブ選別用のネオマイシン及びネガティブ選別用の核酸類似体 FIAU (fluoriodoadenosyluracil)、又はジフテリア毒素の存在下で培養する。この選別によりトラップベクターが挿入された ES 細胞のみが残る。この ES クローンでは、破壊されたエクソンを含む遺伝子がノックアウトされる。得られた細胞を仮親の子宮に移植し、その後生まれるキメラ動物を選ぶ。キメラ動物と正常動物との交配により、ヘテロ接合体動物が得られ、ヘテロ接合体同士の交配によりホモ接合体を得ることができる。

なお、ノックアウトマウスが得られたことの確認は、F1 マウス個体について X 線写真撮影を行い、骨の異常（例えば骨の変形）の有無を観察する。また、外見上の異常の有無及び解剖を行った際の諸組織-臓器の異常を観察することもできる。さらに、組織から RNA を抽出し、ノーザンブロット解析により遺伝子の発現パターンを解析し、必要に応じて血液を採取し、血液検査や血清生化学検査を実施してもよい。

## 6. 遺伝子の単離、組換えベクターの構築及び形質転換体の作製

### (1) 遺伝子の単離

本発明においては、前記の通りトラップされた遺伝子のクローニングを行い、構造解析を行うことができる。

トラップクローンから DNA の単離は、通常行われる手法により行うことができる。例えば、トラップクローンの mRNA からクローニングする場合は、まず、トラップクローンをグアニジン試薬、フェノール試薬等で処理して全 RNA を得た後、オリゴ dT-セルロース又はセファロース 2B を担体とするポリ U-セファロース等を用いたアフィニティーカラム法、あるいはバッチ法によりポリ (A+) RNA (mRNA) を得る。得られた mRNA を鋳型として、オリゴ dT プライマー及び逆転写酵素を用いて一本鎖 cDNA を合成した後、該一本鎖 cDNA から二本鎖 cDNA を合成する。このようにして得られた二本鎖 cDNA を適当な発現ベクター (例えば  $\lambda$ gt11 等) に組み込むことによって、cDNA ライブラリーを得る。

上記の通り得られた遺伝子について塩基配列の決定を行う。塩基配列の決定はマキサム-ギルバートの化学修飾法、又は DNA ポリメラーゼを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法等の公知手法により行うことができる。通常は、自動塩基配列決定装置等により塩基配列を決定することができる。また、cDNA の 5' 領域又は 3' 領域の塩基配列が未決定の場合は、5'-RACE 法、3'-RACE 等を用いて全塩基配列の決定を行う。RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法は、当該技術分野において周知であり (Frohman, M. A. et al., Methods Enzymol. Vol. 218, pp340-358 (1993))、RACE を行うためのキットも市販されている (例えば、Marathon™ cDNA Amplification Kit; CLONETECH 社、その他)。

一旦本発明の遺伝子の塩基配列が決定されると、その後は、化学合成によって、又は決定された当該塩基配列から合成したプライマーを用いた PCR によって、本発明の遺伝子を得ることができる。

## (2) 組換えベクターの構築

目的とする遺伝子断片を精製し、ベクター DNA と連結する。ベクターとしては、ファージベクター、プラスミドベクター等の任意のものを用いることができる。DNA とベクターとの連結手法は、当該分野で周知である (J. Sambrook, et al., Molecular cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等



に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。

### (3) 形質転換体

本発明の形質転換体は、本発明の組換えベクターを、目的遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。ここで、宿主は、本発明の DNA を発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞等が挙げられる。

大腸菌等の細菌を宿主とする場合は、本発明の組換えベクターが該細菌中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボゾーム結合配列、本発明の遺伝子、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。大腸菌としては、例えばエッシャーヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12、DH1 などが挙げられ、枯草菌としては、例えばバチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) などが挙げられる。プロモーターは、大腸菌等の宿主中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えば *trp* プロモーター、*lac* プロモーター、*PL* プロモーター、*PR* プロモーターなどの、大腸菌やファージに由来するプロモーターが用いられる。*lac* プロモーターなどのように、人為的に設計改変されたプロモーターを用いてもよい。細菌への組換えベクターの導入方法は、細菌に DNA を導入する方法であれば特に限定されるものではない。例えばカルシウムイオンを用いる方法 (Cohen, S.N. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69:2110-2114 (1972))、エレクトロポレーション法 (Becker, D.M. et al. : Methods. Enzymol., 194: 182-187 (1990)) 等が挙げられる。

酵母を宿主とする場合は、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) などが用いられる。この場合、プロモーターとしては酵母中で発現できるものであれば特に限定されず、例えば *gal1* プロモーター、*gal10* プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、*MF $\alpha$ 1* プロモーター、*PH05* プロモーター、*PGK* プロモーター、*GAP* プロモーター、*ADH* プロモーター、*AOX1* プロモーター等が挙げられる。酵母への組換えベクターの導入方法は、酵母に DNA を導入する方法であれば特に限定されず、例えばエレクトロポレーション法、スフェロプラスト法 (Hinnen, A. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75: 1929-1933 (1978))、

酢酸リチウム法 (Itoh, H. : J. Bacteriol., 153 : 163-168 (1983)) 等が挙げられる。

動物細胞を宿主とする場合は、COS 細胞、Vero 細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO 細胞)、マウス骨髓腫細胞などが用いられる。プロモーターとして SR $\alpha$  プロモーター、SV40 プロモーター、LTR プロモーター、EF1 プロモーター、PGK プロモーター、MC1 プロモーター等が用いられ、また、ヒトサイトメガロウイルスの初期遺伝子プロモーター等を用いてもよい。動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。

昆虫細胞を宿主とする場合は、Sf9 細胞、Sf21 細胞などが挙げられる。昆虫細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法などが用いられる。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、遺伝子部分とそれ以外の部分における両者の機能解析の概念を示す図である。

図 2 は、本発明のトラップベクターの構築法及び遺伝子のトラップ法の概要を示す図である。

図 3 は、loxP の構造を示す図である。。

図 4 は、lox71 と lox66 との組換えを示す図である。

図 5 は、変異型 loxP による DNA 断片の挿入を示す図である。

図 6 は、本発明のトラップベクターを示す図である。

図 7 は、トラップベクター pU-Hachi の構築図である。

図 8 は、2 段階の変異型遺伝子トラップ法を示す図である。

図 9 は、キメラ動物作製によるトラップシステムの樹立の概要を示す図である。

図 10 は、トラップベクターの組み込み位置を示す図である。

図 11 は、マウスの尾骨の屈曲変異を示す写真である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

### 〔実施例 1〕 遺伝子トラップベクター変異体の作製

#### (1) pU-Hachi トラップベクターの構築

pU-Hachi ベクターは pGT1. 8IRES  $\beta$ -geo に由来し、マウス En-2 遺伝子からの SA 配列と、脳心筋炎ウイルス由来の IRES 配列に連結した  $\beta$ -geo 配列とを含有する。まず、lox71 の BamHI 断片を pGT1. 8IRES  $\beta$ -geo の BglII 部位に挿入した。次いで、ウサギ  $\beta$ -グロビン遺伝子の一部である 180bp の配列、loxP 配列、及びマウスホスホグリセレートキナーゼ-1 (PGK) 由来の poly A 付加シグナルを、ベクター pUC19 の LacZ 配列が除去された改変型ベクターに挿入することにより、プラスミド pEBN-SE7ti を構築した。SP 配列は、トラップベクターの 3' 側を保護するために使用した。プラスミド pEBN-SE7ti の SalI 部位に SA-IRES-lox71- $\beta$ -geo の SalI 断片を挿入することにより、pU-Hachi を得た。

#### (2) pU12 トラップベクターの構築

pU12 トラップベクターを構築するために、まず pE3NSE7 の PGK poly (A) シグナルをピューロマイシン耐性遺伝子+PGK poly (A) シグナルに置き換え、さらにその下流の BglII 部位に lox511 を挿入したプラスミドを作製した。そのプラスミドの SalI 部位に pU-Hachi からの SA-IRES-lox71- $\beta$ -geo の SalI 断片を挿入することにより、pU-12 を得た。

#### (3) pU17 トラップベクターの構築

まず、pSP73 (Promega) に、lox511、loxP、PGK poly (A) シグナル、lox2272 をこの順で挿入し、プラスミド pSP5PP2 を構築した。次に、pU-Hachi の SA 内に 2 箇所ある BamHI のうち上流の BamHI 部位で切断し、pBluescriptII KS+ プラスミドに、SA 前半の BamHI までの DNA 断片、lox71 配列、SA 後半 BamHI から KpnI までの DNA 断片、 $\beta$ -geo の NcoI から SalI 部位までをこの順に挿入し、プラスミド pKS+S71A  $\beta$  geo を構築した。この pKS+S71A  $\beta$  geo から lox71 を含む SA- $\beta$  geo の XbaI 断片を切り出し、これを pSP5PP2 の SpeI 部位に挿入することにより pU-17 を得た。

### 〔実施例 2〕 ES 細胞クローンの選別

pU-Hachi トラップベクターを用いたエレクトロポレーションにおいては、100  $\mu$ g の SpeI で消化した DNA 及び  $3 \times 10^7$  個の細胞を用いた。細胞を 0.8ml の PBS に懸濁し、Bio-Rad Gene Pulser を用いて、800V、3  $\mu$ F の条件でエレクトロポレーションを行った。48 時間後、200  $\mu$ g/ml の G418 の存在下で培養した。選別を 7 日間維持し、コロニーを 24 ウェルプレートにまいて増殖させ、凍結保存した。トラップクロンをサザンブロッティングにより解析し、単一コピーの組み込みパターンを示す細胞株を選別した。

トラップクロンから  $\beta$ -geo 配列を除去するため、pCAGGS-Cre (Araki, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:160-164, 1995; Araki, K. et al., Nucl. Acids Res., 25:868-872, 1997; Araki, K. et al., J. Biochem. Tokyo, 122: 977-982, 1997) を環状の形態でエレクトロポレーションにより導入した。細胞数が  $1.5 \times 10^7$  個、PBS 容量が 0.4ml であることを除き上記と同一の条件でエレクトロポレーションを行った。

処理された細胞の半分を 1 枚の 100mm プレートにまき、48 時間増殖させた。次に、 $1 \times 10^3$  個/プレートの濃度で 100mm のプレートに再度まき、コロニーを形成させた。1 週間後、コロニーを取り上げ、DNA 調製のために増殖させた。

トラップベクターの lox71 部位に組み込みが行われるよう設計した共エレクトロポレーションを行うため、20  $\mu$ g の各プラスミド (p66<sup>2</sup>IEGPPac, p66<sup>2</sup>INZPPac 又は p66PGKPac-5) 及び pCAGGS-Cre を環状形態で使用した。

なお、プラスミド p66PGKPac-5 は、lox66 断片及び PGK プロモーター-ピューロマイシン耐性遺伝子コード配列を、pSP73 ベクター (Promega) に挿入することにより構築した。プラスミド p66<sup>2</sup>IEGPPac は、pSP73 ベクター (Promega)、IRES 配列、EGFP 遺伝子 (Clonetech)、PGK プロモーター、Pca 遺伝子及び lox66 配列から構築した。プラスミド p66<sup>2</sup>INZPPac は、p66<sup>2</sup>IEGPPac の EGFP 遺伝子を、SV40 ラージ T 遺伝子由来の核局在シグナルと融合した lacZ 遺伝子で置換することにより構築した。

PBS 中、 $1 \times 10^7$  個/0.8ml の細胞をエレクトロポレーションにかけた (200V, 950  $\mu$ F)。48 時間後、2  $\mu$ g/ml のプロマイシンを用いて 3 日間選別をかけ、その後通常の培地に細胞を移した。エレクトロポレーション後 9 日目にコロニーを取り上

げ、増殖させた。

公知方法 (Abe, K., Niwa, H. et al., Exp. Cell Res. 229: 27-34, 1996) に従って胚様体 (EB) の生産を行った。ES 細胞中の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性及び EB は、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル  $\beta$ -D-ガラクトピラノシド (X-gal) で染色することにより測定した (Gossler, A. and Zachgo, J., Gene Targeting: A Practical Approach, Joyner, A. (ed.), Oxford University Press, Oxford, 1993, pp. 181-227)。

トラップベクター pU-Hachi を直鎖状にして TT2 ES 細胞に導入した結果、109 個のクローンを単離した。各クローンからゲノム DNA を調製し、pUC プローブ及び少なくとも 3 つの制限酵素を用いてサザンブロッティングを行い、組み込みパターンを検討した。

69% のクローンにおいて単一バンドが確認された。lox71 部位の存在は Cre 媒介組み込みに不可欠であるため、LacZ プローブを用いたサザンブロッティング及び PstI 消化により、その存在を確認した。その結果、10% のクローンが lox71 部位を欠失していた (表 4)。シングルコピーが組み込まれ、かつ lox71 部位が保持されている残り 59% のクローンを、さらに解析するために選択した。

表 4

	単一コピーの組み込み (%)			マルチコピーの組み込み (%)	
	lox71 部位を保持するクローン		lox71 部位を保持しないクローン	2~3 コピー	5 コピー以上
クローンの総数 (%)	プラスミド起源を保持する	プラスミド起源を保持しない			
109 (100)	24 (22)	40 (37)	11 (10)	26 (24)	8 (7)

トラップベクターによる内在性遺伝子の捕獲を評価するため、胚様体形成の前後に X-gal で染色した。表 5 に示す通り、97% のクローンが分化の特定のステージに  $\beta$ -gal 活性を示した。このことは、pU-Hachi トラップベクターを使用すると、他の IRES- $\beta$ -geo ベクターのように有効な遺伝子トラップが行われることを意味する。

表 5

クローン番号 (%)	$\beta$ -geo 発現	
	未分化 ES 細胞	分化した胚様体 (8 日)
26 (41)	+	+
32 (50)	-	+
4 (6)	+	-
2 (3)	-	-

## 〔実施例 3〕 クローンの選択頻度

トラップベクターが 1 コピーのみが組み込まれているクローンを選択するため、選別された neo 耐性クローンから DNA を抽出し、サザンブロット法により解析した。

細胞を SDS/プロテイナーゼ K で溶解し、フェノール/クロロホルム (1:1) (vol/vol) を用いて 2 回処理した。続いてエタノール沈殿を行い、TE バッファー (10mM Tris-HCl, pH7.5/1mM EDTA) に溶解した。6  $\mu$ g のゲノム DNA を適当な制限酵素で消化し、0.9% アガロース電気泳動を行った後、ナイロン膜 (Boehringer Mannheim) 上にブロットした。ハイブリダイゼーションは、DIG DNA Labelling and Detection Kit (Boehringer Mannheim) を用いて行った。

PCR 解析は、以下の反応組成液を用いて、94℃で 1 分、55℃で 2 分及び 72℃で 2 分の反応を 1 サイクルとしてこれを 28 サイクル行った。

PCR に使用したプライマーは以下の通りである。

 $\beta$ -geo 検出用プライマー

Z1 (フォワード) : 5'-gcgttacccaacttaatcg-3' (配列番号 7)

Z2 (リバーズ) : 5'-tgtgagcgagtaacaacc-3' (配列番号 8)

## pUC ベクター配列の複製起点領域の配列検出用プライマー

Ori2 (フォワード) : 5'-gccagtggcgataagtcgtgtc-3' (配列番号 9)

Ori3 (リバーズ) : 5'-cacagaatcaggggataaacgc-3' (配列番号 10)

## 反応組成液

10×PCR バッファー	2 $\mu$ l
10mM dNTP	0.2 $\mu$ l
フォワードプライマー (100pmol/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l
リバープライマー (100pmol/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l
AmpliTaq DNA ポリメラーゼ (Perkin Elmer)	0.2 $\mu$ l
全量 (滅菌蒸留水で調整)	20 $\mu$ l

PCR 反応産物の 2 分の 1 量をアガロースゲルにロードし、解析した。

プラスミドレスキュー (トラップした遺伝子の回収) は、以下の通り行った。

ゲノム DNA (20  $\mu$ g) を適当な制限酵素で処理し、400  $\mu$ l の反応溶液中で連結し、環状分子を得た。フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行った後、DNA を 10  $\mu$ l の TE に懸濁し、DNA 溶液の半量を用いて、エレクトロポレーションにより大腸菌 (*E. coli* STBL2; Life Technologies) を形質転換した。なお、エレクトロポレーションは、Bio-Rad 社の Gene Pulser を使用説明書に従って行った。エレクトロポレーション後の細胞を 1ml の Circle Grow 培地 (BI0101) 中、30℃ で攪拌しながら 1 時間インキュベートした。次に、サンプルを濃縮した後 LB/agar プレートにまき、アンピシリンによるプラスミドの選別を行った。レスキューされたプラスミドについて、制限酵素地図解析及び配列決定を行った。配列は、Thermo Sequenase Fluorescent-Labeled Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham) を用いて決定した。

その結果、表 6 に示す通り、高頻度で組換えを起こしたクローンを得ることができた。

表 6

トラップ クローン	解析した サブクローン の数	組換えを起 こしたサブク ローンの数	組換え 頻度 (%)	プラスミドレスキュー で得られた5'フランキ ング領域の長さ(kb)	プラスミドレスキュー で得られた3'フランキ ング領域の長さ(kb)
Ayu8-003	23	15	65	75	53
Ayu8-016	20	2	10	3.8	4.5
Ayu8-025	23	16	70	1.8	6.5
Ayu8-104	12	5	42	3.5	7
Ayu8-108	12	6	50	5	6

## 〔実施例 4〕 キメラマウスの作製及び遺伝子解析

## (1) マウスへのクローン導入

トラップした ES クローンを、ICR マウス由来の 8 細胞期胚と凝集させ、1 晩培養した。翌日、ES 細胞と 8 細胞期胚とが凝集し合い 1 つの胚盤胞へと発生したものを選択した。これらのキメラ胚約 20 個を不妊雄と交尾した雌（仮親）の子宮の中へ移植した。約 17 日後に出生し、性成熟する生後 8 週以降にキメラマウスを雌マウスと交配し、ES クローン由来の F1 マウス個体を得た。

## (2) 表現型の解析

F1 マウス個体について X 線写真撮影を行い、骨の異常の有無を観察した。

## (3) トラップした遺伝子の解析

トラップされた遺伝子は  $\beta$  geo との融合 mRNA を作っているはずであるので、このことを利用してトラップされた遺伝子を同定した。

F1 個体マウスで X-gal 染色陽性であった組織より mRNA を抽出し、SA 内の配列のプライマーを用いてサーモスクリプト RT-PCR システム (GIBCO BRL) で 1 本鎖 cDNA を合成し、続いて 5' RACE システム (GIBCO BRL) を用いて、SA のエクソン部がつながる、上流のトラップした遺伝子部分の cDNA 断片を得た。得られた断片はプラスミドベクターにクローニングし、塩基配列を決定した。

## (4) 結果

トラップした遺伝子の解析を行った結果の一例を表 7 に示す。

表 7

	クローン番号	遺伝子	表現型
1	Ayu8-R38	Sp1	
2	Ayu8-029	PCM1 (pericentriol material 1)	
3	Ayu3-008	Cyclin B2	
4	Ayu6-003	大腸菌の Ftsj1 遺伝子の 相同物	
5	Ayu8-003	dynamin II	胚致死
6	Ayu8-R16	sui1	
7	Ayu8-016	hnRNP L の上流	
8	Ayu8-019	RNA ポリメラーゼ I	
9	Ayu8-108	importin $\beta$	
10	Ayu8-021	不明	Kinky tail



上記の通り得られた遺伝子のうち PCMI 遺伝子の解析を行った結果、配列番号 11～13 に示す配列 (5'-RACE 部分断片) が得られた。これは、公知の PCMI 遺伝子の配列の一部と一致した。また、Ayu8-021 クローンから得られたマウスは尾骨が屈曲する変異 (kinky tail) が生じていた (図 11)。この変異遺伝子断片の配列を決定した結果、配列番号 14 に示すものであった。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願は、そのまま参考として本明細書に取り入れるものとする。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、遺伝子トラップベクター、及び遺伝子のトラップ法が提供される。本発明によれば、まず、(1) 効率良く遺伝子破壊マウスを作製することができる。トラップベクターのマウス遺伝子への組み込みにより、ほとんどの場合マウス遺伝子は破壊される。したがって、この ES 細胞を利用すれば、マウス遺伝子の破壊マウスを作製できることになる。すなわち、ネオ耐性クロンの選択と 1 コピーのトラップベクターの組み込みクロンの選別により、効率良く遺伝子破壊マウスを作製できることになる。通常の相同組換えによる方法では、1 人の研究者が 1 年間にせいぜい 4 遺伝子の破壊マウスしかできない。本発明の方法によれば、例えば 1 週間に 6 系統樹立し、1 年間に 40 週間働いたとすると、合計 240 系統も樹立できる。従って、上記例の場合は、本発明の方法は通常の方法と比較して 60 倍の効率である。

#### (2) 詳細な遺伝子機能の解析ができる

本発明のトラップ法では、予め機能を持つと思われる遺伝子の各部分に変異を導入しておいて、この変異型遺伝子をトラップベクターに組み込み、その後で、変異遺伝子が組み込まれたトラップベクターをマウスに導入し、その表現型を解析することができる。

#### (3) よりヒトに近い疾患モデルマウスを作製することができる。

ヒトの疾患で発見されたのと同じ突然変異を持つヒト遺伝子をマウス遺伝子に置換して導入できるので、よりヒトに近い疾患モデルマウスを作製することがで

きる。

#### 配列表フリーテキスト

配列番号 1 : 合成 DNA

配列番号 2 : 合成 DNA

配列番号 3 : 合成 DNA

配列番号 4 : 合成 DNA

配列番号 5 : 合成 DNA

配列番号 6 : 相同組換え配列

配列番号 7 : 合成 DNA

配列番号 8 : 合成 DNA

配列番号 9 : 合成 DNA

配列番号 10 : 合成 DNA

#### 参考文献

##### (1) 遺伝子トラップに関連したもの

- 1) Wurst, W. et al., Genetics 139: 889-899, 1995.
- 2) Chowdhury, K. et al., Nucleic Acids Res. 25:1531-1536, 1997.
- 3) Hicks, G. G. et al., Nature Genetios 16: 338-344, 1997.
- 4) Zambrowicz, B. P. et al., Nature 392: 608-611, 1998.

##### (2) Cre-loxP に関連したもの

- 1) Sauer, B. and Henderson, N. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5166-5170, 1988.
- 2) Lakso, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6232-6236, 1992.
- 3) Gu, H. et al., Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced 1993.
- 4) Albert, H. et al., Plant J. 7: 649-659, 1995.
- 5) Schwenk, F. et al., Nucleic Acids Res. 23: 5080-5081, 1995.

##### (3) 遺伝子トラップ関連文献リスト

- 1) Miyazaki, J. et al., Gene 79: 269-277, 1989.
- 2) Niwa, H. et al., Gene 108: 193-200, 1991.
- 3) Niwa, H. et al., J. Biochem, 113: 343-349, 1993.
- 4) Niwa, H. et al., Gene 169: 197-201, 1996.
- 5) Abe, K., Niwa, H. et al., Exp. Cell Res. 229: 27-34, 1996.
- 6) Araki, K. et al., Nucleic Acid Res. 25: 868-872, 1997.
- 7) Araki, K. et al., J. Biochem. 122: 977-982, 1997.
- 8) Oike, Y. et al., Human Mol. Genet-In Press
- 9) Oike, Y. et al., Blood in press

## 請求の範囲

1. 逆反復配列 1、スペーサー配列及び逆反復配列 2 の順で構成される loxP 配列のうち逆反復配列 1 の一部の配列に変異が導入された変異型 loxP を含むトラップベクター。
2. 変異型 loxP が lox71 である請求項 1 記載のトラップベクター。
3. lox71 が配列番号 1 に示されるものである請求項 2 記載のトラップベクター。
4. 逆反復配列 1、スペーサー配列及び逆反復配列 2 の順で構成される loxP 配列のうち逆反復配列 2 の一部の配列に変異が導入された変異型 loxP を含むトラップベクター。
5. 変異型 loxP が lox66 である請求項 4 記載のトラップベクター。
6. lox66 が配列番号 2 に示されるものである請求項 5 記載のトラップベクター。
7. 以下の (a) ~ (h) のトラップベクター。
  - (a) SP-SA-lox71-IRES-M-loxP-PV-SP
  - (b) SP-lox71-IRES-M-loxP-PV-SP
  - (c) SA-lox71-IRES-M-loxP-pA-PV-SP
  - (d) SA-lox71-IRES-M-loxP-puro-pA-PV-SP
  - (e) lox71-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511
  - (f) lox71-IRES-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511
  - (g) (lox71 が組み込まれた SA)-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511
  - (h) (lox71 が組み込まれた SA)-IRES-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511
  - (i) (lox71 が組み込まれた SA)-M-loxP-pA-lox2272-プロモーター-M-lox511-SD(SP は任意配列を、SA はスプライスアクセプターを、SD はスプライスドナーを、IRES は分子内リボゾームエントリー部位を、M はマーカー遺伝子を、puro はを、pA はポリ A 配列を、PV はプラスミドベクターを表す。)
8. プラスミドベクターが pBR、pUC、pSP 及び pGEM からなる群から選択されるいずれか 1 つである請求項 7 記載のトラップベクター。
9. 請求項 1 記載のトラップベクターと請求項 4 記載のトラップベクターとが組換えを起こしたベクター。

10. 他の loxP との間で組み換えが起こらないものである請求項9記載のベクター。
11. 請求項1～8のいずれかに記載のトラップベクターを胚幹細胞に導入することを特徴とする遺伝子トラップ方法。
12. 請求項1～8のいずれかに記載のトラップベクターが導入された胚幹細胞。
13. 請求項1～8のいずれかに記載のトラップベクターが導入されたトランスジェニック動物。
14. 動物が、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ブタ、ヒツジ及びヤギからなる群から選択されるいずれか1種である請求項13記載のトランスジェニック動物。
15. 請求項12記載の胚幹細胞を動物に導入することを特徴とするトランスジェニック動物の作製方法。
16. 請求項1～8のいずれかに記載のトラップベクターが導入されたノックアウト動物。
17. 動物が、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ブタ、ヒツジ及びヤギからなる群から選択されるいずれか1種である請求項16記載のノックアウト動物。
18. 請求項12記載の胚幹細胞を動物に導入することを特徴とするノックアウト動物の作製方法。

図 1

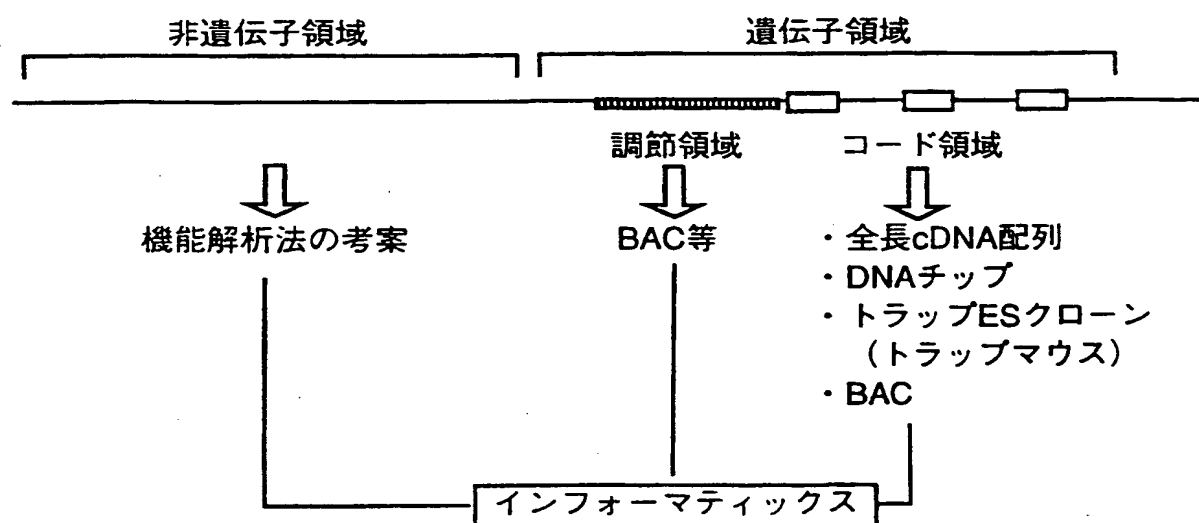


図 2

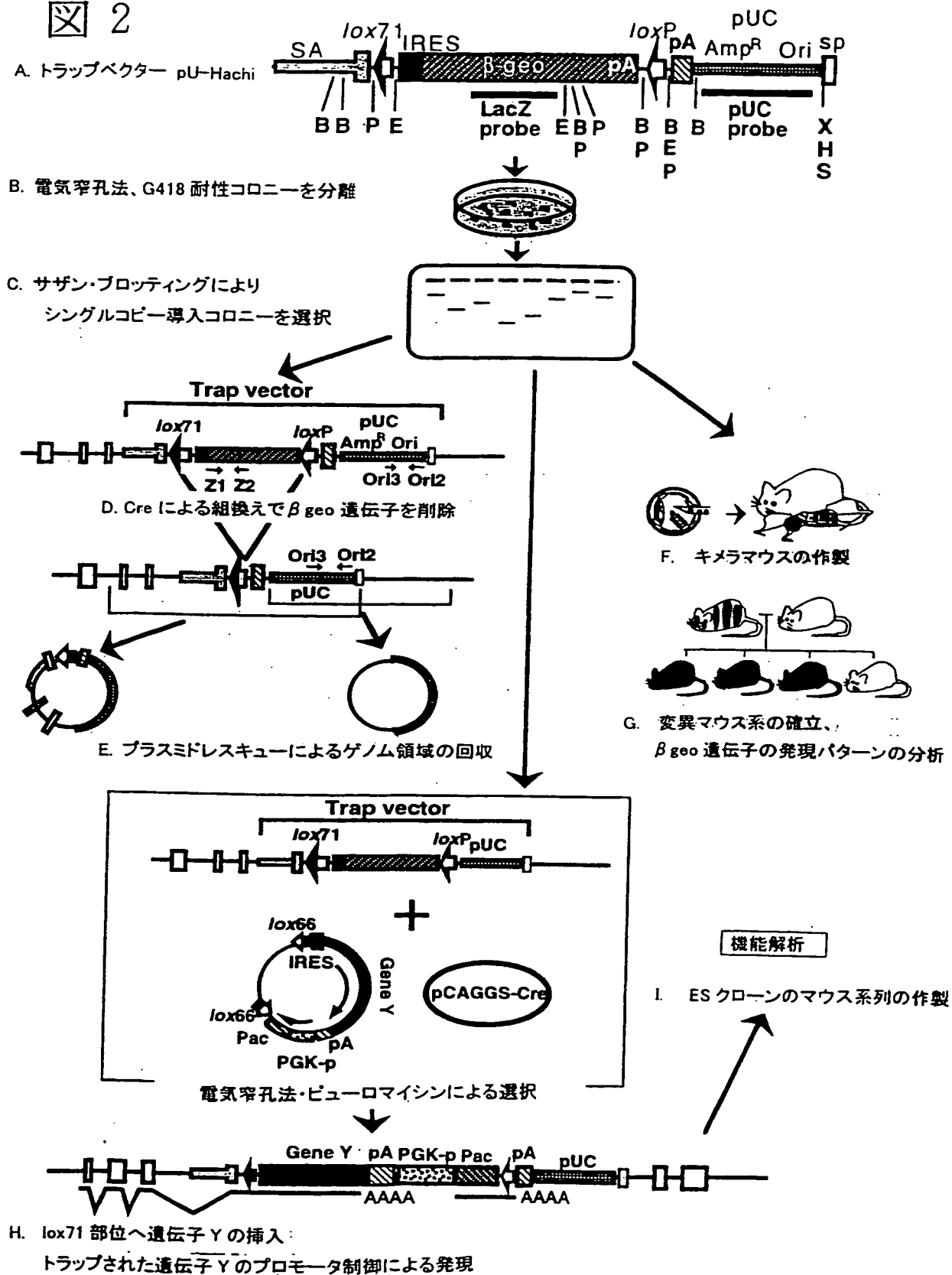


図 3

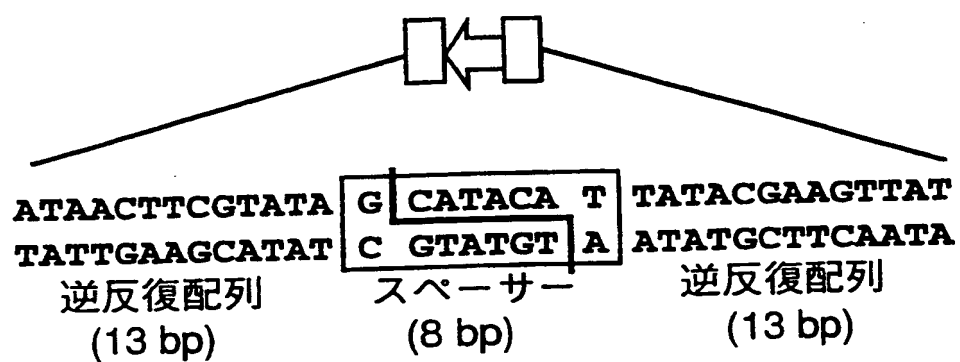




图 4

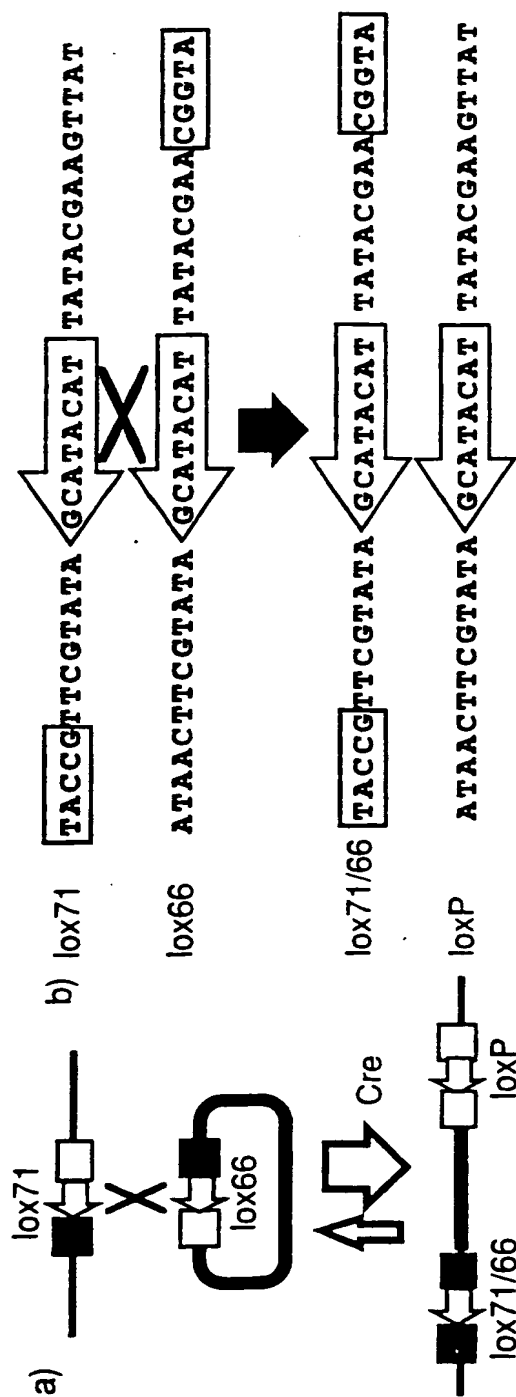


図 5

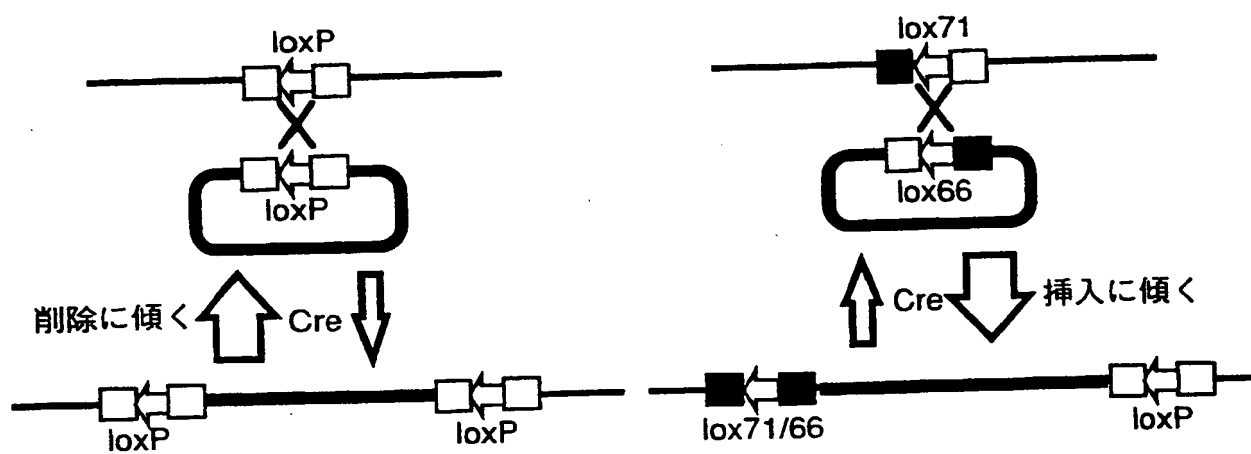


Figure 6 illustrates the structure of several plasmid vectors (pU-8, pU-12, pU-15, pU-16, pU-17, pU-18) used in the invention. Each vector contains a  $\beta$ -geo gene flanked by loxP sites, and various other elements like SA, IRES, pA, puro, pUC, and pSP.

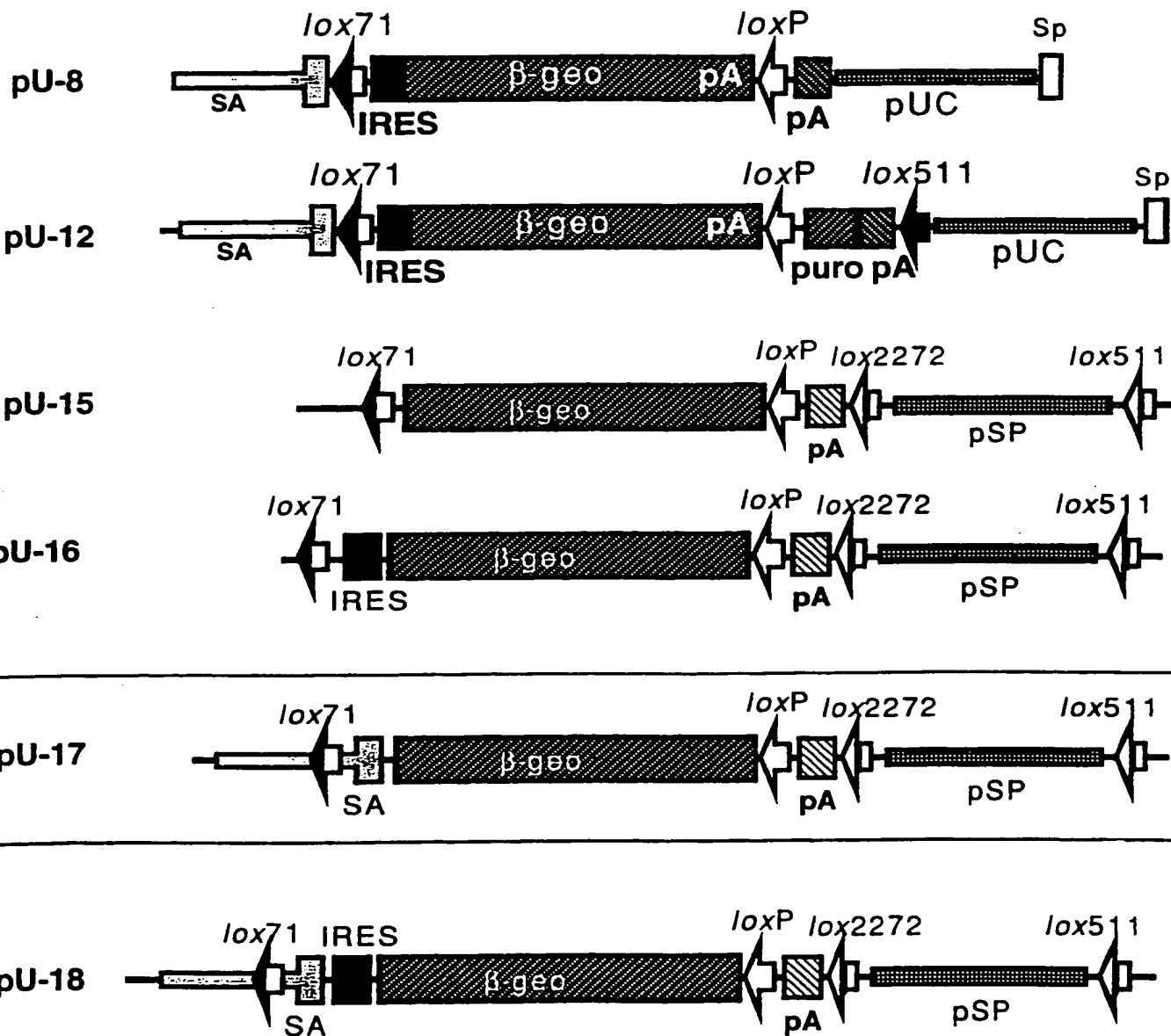


図 7

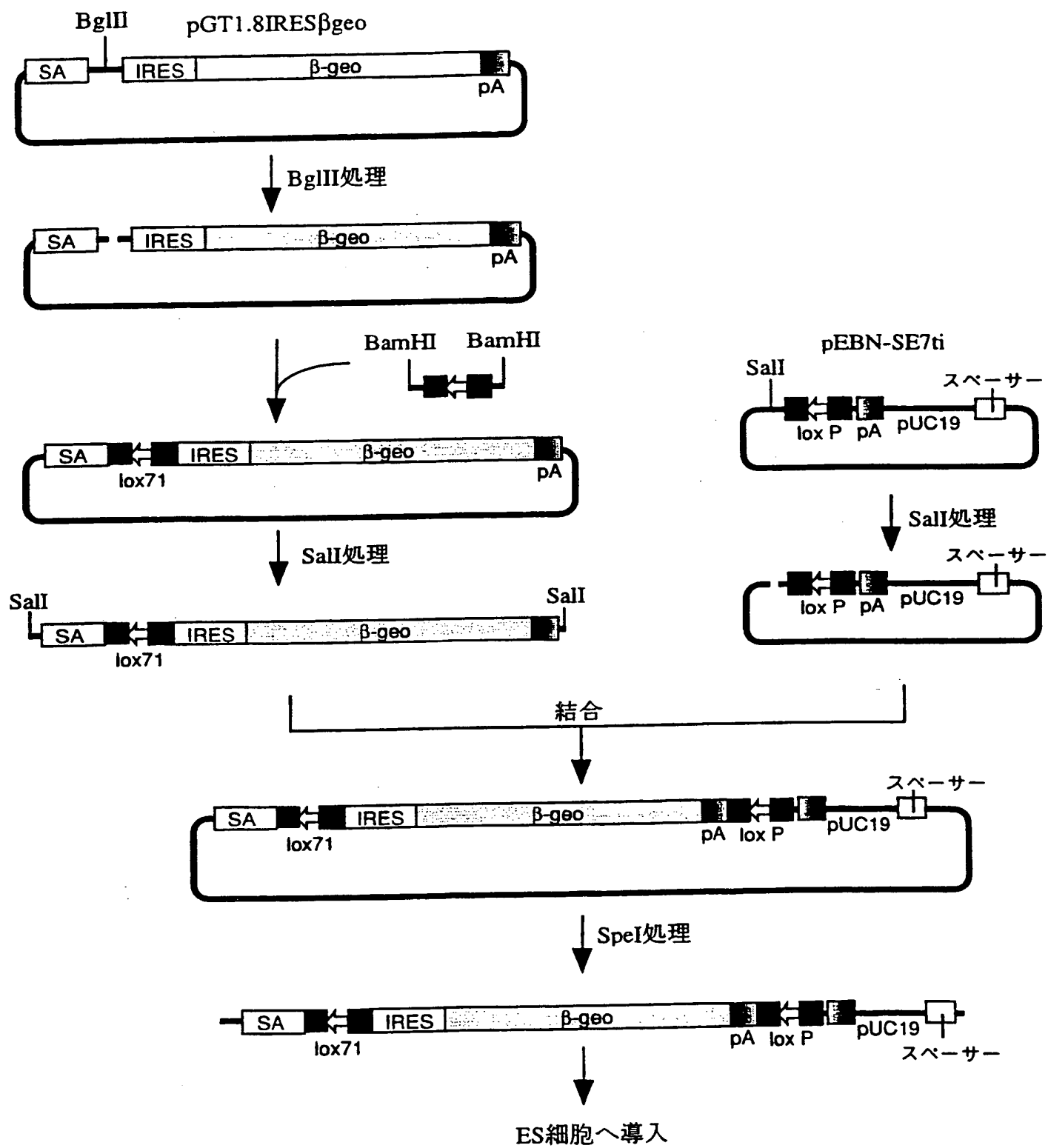


図 8

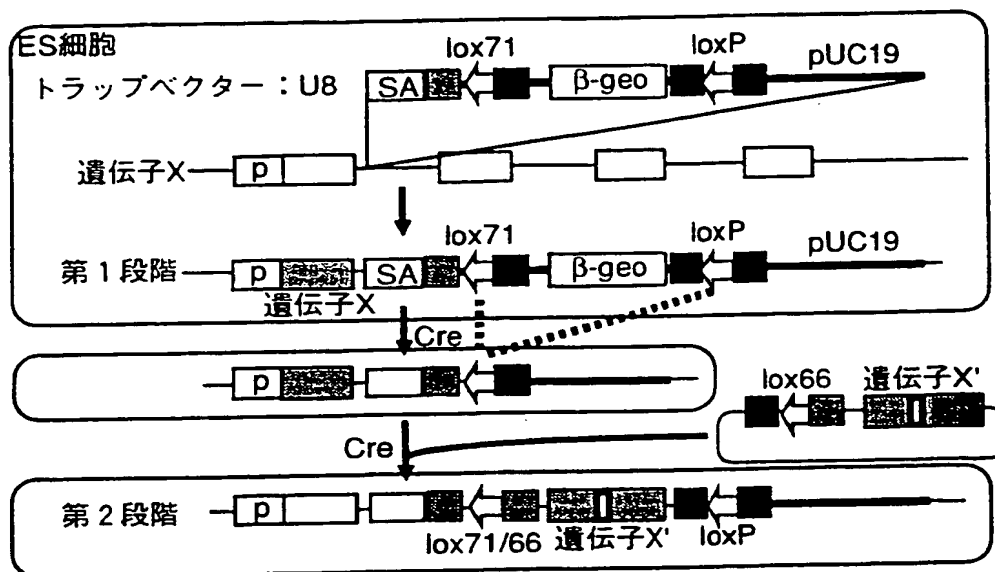
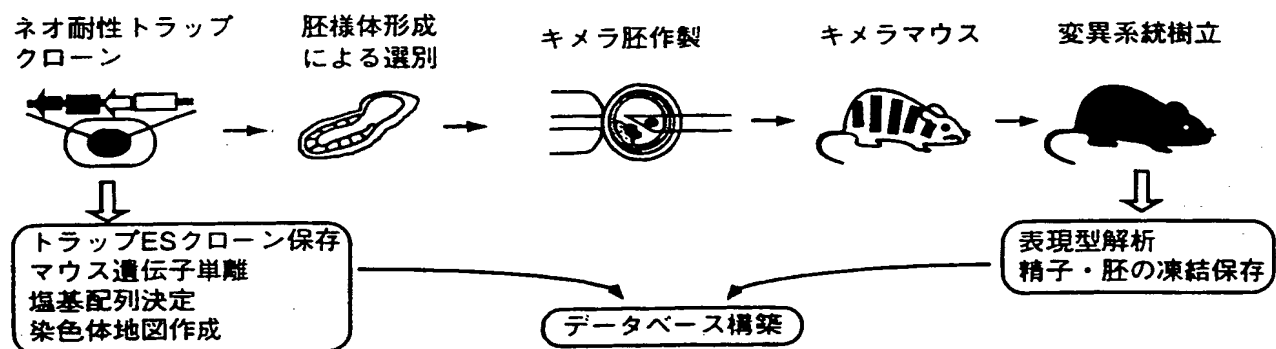


図 9



☒ 1 0

**Promoter** Sp1 (Ayu8-38)**Exon** Crk (Ayu8-104)**Intron** CBP (Ayu3-112)

Cyclin B2 (Ayu3-8)

Ftsj1 (Ayu6-03)

sui1 (Ayu8-16)

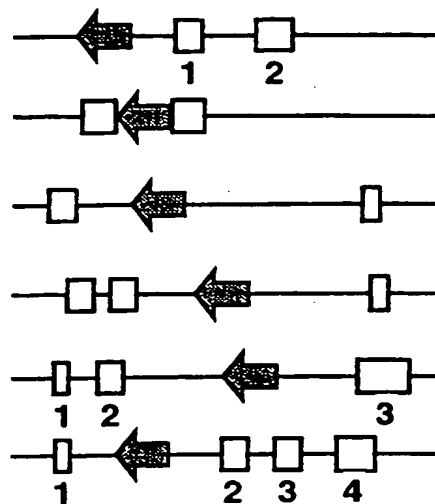
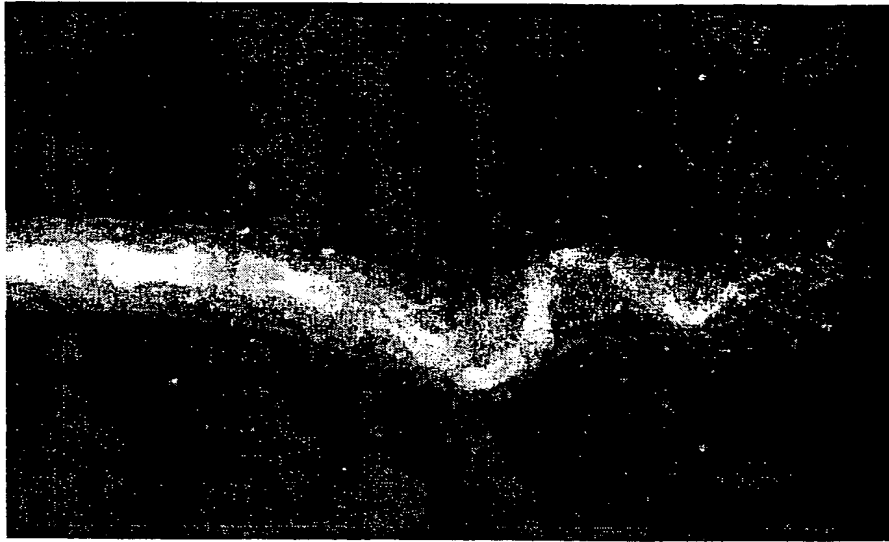


図 1 1



Ayu8021 のテイルの異常



## 配列表

## SEQUENCE LISTING

<110> KUMAMOTO TECHNOPOLIS FOUNDATION

<120> TRAPVECTOR

<130> PH-976PCT

<150> JP99/200997

<151> 1999-07-14

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 1

taccgttcgt ata

13

<210> 2

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 2

tatacgaacg gta

13

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 3

ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttat

34

<210> 4

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 4

ataacttcgt ata

13

<210> 5

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 5

tatacgaagt tat

13

<210> 6

<211> 34

<212> DNA

<213> Other

<220>

<223> Homologous recombination sequence

<400> 6

taccgttcgt atagcataca ttatacgaac ggta

34

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 7

gcgttaccca acttaatcg

19

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 8

tgtgagcgag taacaacc

18

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 9

gccagtggcg ataagtcgtg tc

22

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 10

cacagaatca ggggataacg c

21

<210> 11

<211> 400

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 11

```

agaaacttaa acagcggata aacttcagtg atttanaatca gagaagtatt ggaagtgatt 60
ctcaagggtan agcaacagcg gctaacaaca aacgtcagct tagtgaaaac cgaaagccct 120
tcaacttttt gcctatgcag attaataacta acaagagcaa ggatgctact gcaagtcctc 180
caaagagaga gatgacaacg tcagcacagt gcaaagagtt gtttgcttct gctctaagta 240
atgacctttt gcaaaactgt caatctctga agaagatggg agaggggagc ctgcatggga 300
aacaccagat tgtaagcagg ctgtttcaat cctgactata ttactaaagc tagttctatg 360
cnanaagttt tgtaanaaaa atgaaagtc t gcaatgttga 400

```

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 416

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 12

```

tcttctagct ttgcagcata aagcagagca agctatnagc tgtgatggat gactctgttg 60
ttacagaaac tacaggaagc ttatctggag tcagcatcac atctgaacta aatgaagaac 120
tgaatgattt aattcagcgt ttccataatc agcttcgtga ttctcagcct ccagctgttc 180
cagacaacag aagacaggca gaaagtcctt catttaactag agagatttct cagagcagaa 240
atccctcagt ttctgaacat ttacctgatg agaaagtaca gcttttttagc aaaatgagag 300
tactacagga aaagaacaag aaatggacaa attagttggg agaacttcat aaccttcgag 360
atnagcatct gaacaactca tcatttgtgc cntcaacttc ncnccaaaga agtggg 416

```

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 484

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 13

gtttctacac ctactgaaca gcagcagcca tttagctcaa aatccttnca ggnaaaaaca 60  
 gagtataatgg cttttccaaa accctctgna aagcagttct tctcttggag cagaaaagca 120  
 aaggaatcaa gaaacagccc gaagaggaag ctgaaaacac taagacacca tggttataatg 180  
 atcaagaagg tggagtagaa aaaccatttt tcaagactgg atttacagag tctgtagaga 240  
 aagntacaaa atagtanccg caaaaatcaa ccagatacaa gcaggagaag acgtcggttt 300  
 gatgaagaat cccttggaaa gcttttagcag tatgcctgat cctatagacc caacatcagt 360  
 aactaaaaca tttaaaacaa gaaaagcatc tgcccaggcc agcctggcct ctaaggacaa 420  
 aactcccaaa tcaaagagta agaagaggat tctactcagc tgaaaagtag agttaaaaat 480  
 attg 484

<210> 14

<211> 211

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 12

ctgtctgtca ttgtcgttct cctttagaag gcagaaaaga aatgggaaga aaaaaggcaa 60  
 aatctggaac actataacgg aaaggagtic gagaagctcc tggaggaagc tcaggccaac 120  
 atcatgaagt caattccaaa cctggagatg cccccagctt ccagcccagt gtcaaaggga 180  
 gatgcggcag gggataagct ggagctgtca g 211

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02916

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/85, A01K 67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/85, A01K 67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GeneSeq/DDBJ/GenBank/EMBL

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ARAKI K. et al., "Targeted integration of DNA using mutant lox sites in embryonic stem cells", Nucleic Acids Research (1997), Vol.25, No.4, pp.868-872	1-18
A	ARAKI K. et al., "Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: comparison of various promoters", Journal of Biochemistry (1997), Vol.122, No.5, pp.977-982	1-18
A	IRMGARD S. et al., "Selective disruption of genes transiently induced in differentiating mouse embryonic stem cells by using gene trap mutagenesis and site-specific recombination", Molecular and Cellular Biology (1998), Vol.18, No.5, pp.3081-3088	1-18
A	LI Z. et al., "Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells", Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America (1996), Vol.93, No.12, pp.6158-6162	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
21 June, 2000 (21.06.00)

Date of mailing of the international search report  
04 July, 2000 (04.07.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/02916

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/85, A01K 67/027

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/85, A01K 67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), GeneSeq/DDBJ/GenBank/EMBL

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	ARAKI K., et al. "Targeted integration of DNA using mutant lox sites in embryonic stem cells", Nucleic Acids Research (1997), Vol. 25, No. 4, p. 868-872	1-18
A	ARAKI K., et al. "Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: comparison of various promoters", Journal of Biochemistry(1997), Vol. 122, No. 5, p. 977-982	1-18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日  
21.06.00国際調査報告の発送日  
04.07.00

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
富永 みどり

4N 9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	IRMGARD S., et al. "Selective disruption of genes transiently induced in differentiating mouse embryonic stem cells by using gene trap mutagenesis and site-specific recombination", Molecular and Cellular Biology(1998), Vol. 18, No. 5, p. 3081-3088	1-18
A	LI Z., et al. "Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells", Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America(1996), Vol. 93, No. 12, p. 6158-6162	1-18



(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

**EP 1 201 759 A1**

(12)

**EUROPEAN PATENT APPLICATION**

published in accordance with Art. 158(3) EPC

(43) Date of publication:  
**02.05.2002 Bulletin 2002/18**

(51) Int Cl.7: **C12N 15/85, A01K 67/027**

(21) Application number: **00922969.1**

(86) International application number:  
**PCT/JP00/02916**

(22) Date of filing: **02.05.2000**

(87) International publication number:  
**WO 01/05987 (25.01.2001 Gazette 2001/04)**

(84) Designated Contracting States:  
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE**  
Designated Extension States:  
**AL LT LV MK RO SI**

(72) Inventors:  
• **YAMAMURA, K.**  
**Inst. Of Molecular Embryology & Genet  
Kumamoto-shi, Kumamoto 862-0976 (JP)**  
• **ARAKI, Kimi**  
**Inst. Of Molecular Embryology & Genet.  
Kumamoto-shi, Kumamoto 862-0976 (JP)**

(30) Priority: **14.07.1999 JP 20099799**

(71) Applicant: **Transgenic Inc.**  
**Kumamoto-shi, Kumamoto 860-0802 (JP)**

(74) Representative: **Maschio, Antonio**  
**D Young & Co,**  
**21 New Fetter Lane**  
**London EC4A 1DA (GB)**

**(54) TRAP VECTOR AND GENE TRAPPING METHOD BY USING THE SAME**

(57) A trap vector containing a *loxP* sequence composed of inverted repeat sequence 1, a spacer sequence and inverted repeat sequence 2 in this order, the *loxP* sequence being a mutant *loxP* wherein a part of the inverted repeat sequence 1 or 2 is mutated.

**EP 1 201 759 A1**

## Description

## TECHNICAL FIELD

5 [0001] The present invention relates to random mutation ES clone technology using gene trapping.

## BACKGROUND ART

10 [0002] It is said that structural analysis of human genome will be completed in or before 2003 as the human genome project is progressing well. Now, the age of isolating genes one by one and analyzing their structures separately seems to be over, and we have come into the age of "structural analysis" of genome.

[0003] With the nucleotide sequence of genome alone, however, information on functions is insufficient. Thus, a novel analysis system for functional analysis is needed. Further, although one of the major goals of human genome analysis is to elucidate causative genes in human diseases, such diseases cannot be explained with the structures of causative genes alone.

[0004] Accordingly, production of model individuals is an indispensable assignment in order to analyze processes of disease development and to develop new treatment methods after the identification of causative genes.

20 [0005] On the other hand, if genome is divided into gene regions and non-gene regions in terms of structure, it is considered that these two parts have separate functions and that it is necessary to analyze the functions of both parts (Fig. 1). From the viewpoint of entire genome, each gene is performing only a part of the entire function. Genome is not a mere collection of genes and may have unknown functions. In fact, a new concept "position effect mutation" has been established. From this, it is presumed that genome has regions of unknown functions.

25 [0006] Gene regions are composed of regulatory regions and coding regions. At present, the target of genome functional analysis is coding regions. When mouse is compared with human, the kinds of genes they have are almost equal. Therefore, functional analysis of the regulatory region is important. There is difference in species between mouse genes and human genes. It is believed that this difference is not due to difference in protein but due to difference in the regulation of gene expression.

30 [0007] The function of a transcription factor or the like involved in the regulation of gene expression can be elucidated from the sequence of the coding region of the relevant gene. The analysis of the functions of those elements to which the transcription factor binds is extremely difficult at present because a number of those elements exist in the regulatory region of one gene. However, as a technique of functional analysis, a method using bacterial artificial chromosomes may be considered.

35 [0008] It is considered that functional analysis of coding regions may be performed at the mRNA level, protein level, cell level, tissue/organ level and individual (i.e. whole animal) level. It is believed that such analysis at the mRNA level can be performed using DNA chips. On the other hand, the use of embryonic stem (ES) cells seems to be the best way for performing functional analysis at other levels, because various cell and tissue derivative systems have been developed directly from ES cells *in vitro* and a number of such systems are expected to be developed in the future. Furthermore, the use of ES cells is advantageous in that individual level analysis systems can be established.

40 [0009] From the foregoing, it is understood that gene knockout at ES cell level and production of knockout mice in which the relevant genes are knocked out are extremely important in functional analysis of genome.

[0010] To date, homologous recombination using ES cells has played a major role in the production of knockout mice. However, considering this method not as a strategy of producing knockout mice separately but from a strategic viewpoint of producing knockout mice comprehensively, this method has serious problems.

45 [0011] First, this method requires too much time. In the production of knockout mice, it is the rate-determining step to isolate knockout ES clones generated through homologous recombination using ES cells. Even a skillful researcher needs at least three months for isolating a knockout ES clone. Thus, only four genes can be knocked out in one year. Accordingly, in the case of introducing each one mutation into  $10^5$  genes, 2,500 researchers are required for one year. It is estimated that approximately 1,000 lines of knockout mice are produced in one year in the world. This means that it would take 100 years to produce  $10^5$  knockout ES clones. This is so unrealistic compared to the advance in the structural analysis of human genome that is to be completed in 2003.

50 [0012] Secondly, this method requires too much cost. At least 2 to 4 million yen is necessary to produce one line of knockout mouse excluding personnel expenses and depreciation expenses. Thus, production of  $10^5$  simple knockout mice requires 200 to 400 billion yen.

55 [0013] As described above, the conventional homologous recombination using ES cells has problems, and genome is vast. However, the number of genes in genome is limited. Thus, it is necessary to isolate from genome those genes having important functions. In many cases, the function of a gene is elucidated only after production of a knockout mouse in which the relevant gene is disrupted. Therefore, knockout mice are directly connected with future development of epoch-making drugs and have extremely high value added. Under circumstances, it has become the world's "strat-

egy" to produce mutant mice at random and in large scale. At present, the three methods described below are considered most reasonable in the production of random mutation mice.

[0014] The first one is a method using ethylnitrosourea (ENU), a mutagen. A project of large-scale mutant production using ENU has been started in Europe. In Germany, Dr. Balling of the Institute of Mammalian Genetics and others started this project in 1997 as a part of the human genome project. In England, supported by SmithKline Beecham, Dr. Brown and others started this project at MRC Mouse Genome Center in Harwell aiming at establishment of mutant mice having mutations mainly in brain/nervous system. To date, these two groups have established approximately 200 lines of mutant mice exhibiting dominant inheritance. The project is proceeding more efficiently than expected. In the United States, it has been decided that structural analysis of mouse genome and production of mutant by the ENU method start with a huge budget (6 billion yen/year) at Case Western Reserve University, Oak Ridge National Laboratory, etc.

[0015] When ENU is administered to adult male mice, ENU acts on spermatogoniums before meiosis and causes about 50 to 100 point mutations per spermatogonium at random. Mutations occur at a frequency of 1/1,000/gamete per locus. Therefore, by crossing one treated male mouse with one normal female mouse, many kinds of mutant mice can be produced in F1 generation. In the method using ENU, if 1,000 mice are screened for a specific locus, one mouse has a mutation caused in that locus in terms of probability. Thus, this method is considered highly efficient.

[0016] The second method is a method using chlorambucil that is also a mutagen. This method causes mutations in spermatogoniums at the same frequency as in the method using ENU. However, these mutations are deletion mutations, and sometimes as many as one megabases may be deleted.

[0017] The third method is a method using gene trapping. Gene trapping is a technique that was developed for the purpose of searching for unknown genes by introducing trap vectors containing a marker gene into ES cells and then monitoring the expression of the marker gene. Trap vectors are integrated into ES cells at random and, as a result of their integration, endogenous genes (genes present in cells and tissues inherently) are disrupted in most cases. Therefore, preparing chimeric mice from such ES cells can produce various knockout mice.

[0018] However, each of the methods using a mutagen and the method using gene trapping has an advantage(s) and a drawback(s) (Table 1).

Table 1

	ENU Method	Chlorambucil Method	Gene Trapping
Nature of Mutation	Point mutation	Deletion mutation	Any desired mutation
Production of Mutant Mouse	Easy	Easy	Difficult
Identification of Mutant Mouse	Difficult	Medium	Easy
Other Features			Can use ES trap clones

[0019] According to the ENU method, production of mutant mice is easy, but establishment of individual mutant lines is not easy because segregation by crossing should be conducted. Further, in order to identify mutated genes, the relevant locus should be identified first by linkage analysis using polymorphic DNA markers, and then the gene should be isolated by positional cloning. Thus, the ENU method requires complicated operations.

[0020] According to the chlorambucil method, production of mutant mice is easy, but deleted sites should be identified. For that purpose, analysis must be made using a number of polymorphic DNA markers. Besides, generally, methods using a mutagen such as chlorambucil need large breeding rooms. Thus, such methods require much expenses and labor.

[0021] Although the gene trap method requires labor and technology for producing mutant mice, identification of mutated genes is easy and experiments can be conducted according to the size of breeding rooms. Gene trap ES clones *per se* are precious resource for functional analysis of genome. The gene trap method is also remarkably different from other methods in this point.

[0022] Some laboratories in the world have already started production of mutants by gene trapping. In the United States, a private firm Lexicon Genetics Incorporated is undertaking random disruption by gene trapping using retrovirus vectors. However, ordinary researchers can hardly use this service because of the following reasons. Briefly, it is not sure whether an endogenous gene is disrupted or not even if the gene is trapped; it is not clear whether germline chimeric mice can be produced; an additional charge is required for the production of chimeric mice; and considerable charges are required for using the service. In Germany, gene trapping is performed toward a goal of 12,000 clones as a part of the ENU project. Anyway, these are proceeding focusing on the analysis of trapped genes rather than the establishment of mouse lines.

## DISCLOSURE OF THE INVENTION

**[0023]** The problem for solution by the invention is to overcome the problems that conventional gene trap methods have, to develop a novel "exchangeable gene trap method" that seems almost ideal, to establish ES trap clones in large scale using the above method, and to produce mouse mutants using the trap clones. Thus, it is an object of the invention to provide trap vectors; a method of gene trapping; transgenic or knockout animals in which a trapped gene is introduced; and trapped genes.

**[0024]** As a result of intensive and extensive researches toward the solution of the above problems, the present inventors have reached an idea of using the bacteriophage-derived recombination system *Cre-loxP* in gene trapping. Thus, the present invention has been achieved. Cre is a recombinase that recognizes a *loxP* sequence and causes recombination at that site.

**[0025]** The present patent application provides the following inventions:

(1) A trap vector containing a *loxP* sequence composed of inverted repeat sequence 1, a spacer sequence and inverted repeat sequence 2 in this order, the *loxP* sequence being a mutant *loxP* wherein a part of inverted repeat sequence 1 or 2 is mutated.

As a specific example of the mutant *loxP* in which a part of its inverted repeat sequence 1 is mutated, *lox71* (e.g. the sequence shown in SEQ ID NO: 1) may be given. As a specific example of the mutant *loxP* in which a part of its inverted repeat sequence 2 is mutated, *lox66* (e.g. the sequence shown in SEQ ID NO: 2) may be given.

(2) A vector generated from recombination between a trap vector containing a mutant *loxP* wherein a part of inverted repeat sequence 1 is mutated and a the trap vector containing a mutant *loxP* wherein a part of inverted repeat sequence 2 is mutated.

(3) A trap vector selected from the group consisting of the following (a) to (i):

- (a) SD-SA-*lox71*-IRES-M-*loxP*-PV-SP
- (b) SP-*lox71*-IRES-M-*loxP*-PV-SP
- (c) SA-*lox71*-IRES-M-*loxP*-pA-PV-SP
- (d) SA-*lox71*-IRES-M-*loxP*-*puro*-pA-PV-SP
- (e) *lox71*-M-*loxP*-pA-*lox2272*-PV-*lox511*
- (f) *lox71*-IRES-M-*loxP*-pA-*lox2272*-PV-*lox511*
- (g) (*lox71*-integrated SA)-M-*loxP*-pA-*lox2272*-PV-*lox511*
- (h) (*lox71*-integrated SA)-IRES-M-*loxP*-pA-*lox2272*-PV-*lox511*
- (i) (*lox71*-integrated SA)-M-*loxP*-pA-*lox2272*-promoter-M-*lox511*-SD,

wherein SP represents any sequence; SA represents a splice acceptor; SD represents a splice donor; IRES represents an internal ribosomal entry site; M represents a marker gene; *puro* represents puromycin resistance gene; pA represents a poly(A) sequence; and PV represents a plasmid vector.

In the trap vectors (a) to (i) described above,  $\beta$ -geo gene may be given as a specific example of the marker gene, and pBR322, pUC plasmids (pUC18, pUC19, pUC118, pUC119, etc.), pSP plasmids (pSP64, pSP65, pSP73, etc.) and pGEM plasmids (pGEM-3, pGEM-4, pGEM-3Z, etc.) may be enumerated as specific examples of the plasmid vector.

(4) A method of gene trapping comprising introducing any of the above-described trap vectors into embryonic stem cells, and embryonic stem cells into which the trap vector is introduced by the method.

(5) A method for producing a transgenic animal or knockout animal comprising introducing the above-described embryonic stem cells into an animal, and a transgenic animal or knockout animal produced by the method.

**[0026]** As a specific example of the above animal, one selected from the group consisting of mouse, rat, rabbit, guinea pig, pig, sheep and goat may be given.

**[0027]** Hereinbelow, the present invention will be described in detail. The present specification encompasses the contents of the specification and/or drawings of the Japanese Patent Application No. 11-200997 based on which the present application claims priority.

**[0028]** The present invention relates to a method of gene trapping, transgenic or knockout animals into which a trapped gene is introduced, and trapped genes. An outline of the method of gene trapping according to the invention is shown in Fig. 2. First, in order to achieve the object of the present invention, a trap vector is constructed and introduced into ES cells, followed by isolation and selection of trap clones (Fig. 2A-C). In Fig. 2, pU-Hachi vector is exemplified. Subsequently, chimeric animals (e.g. chimeric mice) are produced, followed by production of mutant mice derived from the trap clone (Fig. 2F-G). On the other hand, using the trapped and selected clone, isolation and sequencing of the trapped gene as well as recovery of the genome by plasmid rescue are performed (Fig. 2C-E). Further, the clone is

subjected to electroporation and selection with a drug such as puromycin to thereby trap a gene of interest. Then, the trapped gene is expressed, followed by production of ES clone-derived mouse lines (Fig. 2H-I).

[0029] The present invention can be summarized as follows (including pilot studies).

#### (1) Overall Efficiency

##### (1-1) Screening by Formation of Embryoid Bodies

[0030] One hundred and six neomycin resistant clones were suspension-cultured for the formation of embryoid bodies. The expression of  $\beta$ -galactosidase was analyzed at the stage of ES cells and after the induction of differentiation. As a result, it was found that 90 trap clones (86%) were expressing  $\beta$ -galactosidase at any one of the above stages.

##### (1-2) Selection of Clones Indicating Single Copy Integration

[0031] DNA was extracted from 109 trap clones that had expressed the marker gene during the process of embryoid body formation, and then integration patterns of the trap vector were analyzed. As a result, 75 clones (70%) had a single copy integrated. Of these, 24 clones (22%) were complete (i.e. retained the replication origin of the plasmid) and 40 clones (37%) lacked pUC. Even if pUC was lost, it could be re-inserted by using lox71 site. Therefore, these 64 clones (59%) were found to be useful (Table 4).

##### (1-3) Efficiency of Germline Chimera Production

[0032] Chimeric mice were produced using the above-mentioned trap clones. As a result, germline chimeric mice were obtained from approximately one half of the clones.

##### (1-4) Summary of the Entire Experiment

[0033] It was found that about 26% of the neomycin resistant clones selected initially reached the final stage of the experiment. Since the efficiency of germline chimera production is now increasing, it is believed that the overall efficiency can be increased further. However, the efficiency achieved at this time seems to be sufficient for the practice of researches.

#### (2) Efficiency of the Gene Trap Method

[0034] As a result of the tests so far conducted, 24 trap lines were established. Of these, 13 lines have proceeded to analysis at the gene level. Nucleotide sequences of these lines were compared with GenBank and EMBL databases using BLAST program. The results were as follows: 9 clones individually trapped a known gene; 3 clones individually trapped an EST; and the remaining 1 clone trapped an unknown gene (Table 2). According to the reports so far made by other researchers, 10-25% of trapped genes are known genes; 10-20% are ESTs; 50-80% are unknown genes; and 2-10% are repeats.

Table 2

	Known Gene	EST	Unknown Gene	Repeat
Present Invention	9 (69.2%)	3(23.1%)	1(7.7%)	
Previous Reports	10-25%	10-20%	50-80%	2-10%

#### (3) Trapped Genes

[0035] The inventors examined whether those genes involved in development and cell growth had been efficiently trapped or not by ascertaining the kinds of known genes by a screening method utilizing formation of embryoid bodies. As a result, it was found that the known genes were CBP (CREB binding protein) and Sp1 that are transcription factors; cyclin B2 involved in cell cycle; Crk and pHPs1-2 involved in signal transduction; rRNA, snRNP L and RNA polymerase I; and mitochondrial DNA (Table 3). Thus, it was found that very common genes were trapped. A major part of these genes are involved in cell growth. This suggests that the screening system utilizing formation of embryoid bodies works well.

Table 3

Class	Clone No.	Gene
1. Nucleus		
(1) Transcription	Ayu3-112	CBP
	Ayu8-038	Sp1
(2) Cell Cycle	Ayu3-008	Cyclin B2
	Ayu6-003	Homologous to the <i>E. coli</i> cell division protein Ftsj1
(3) Signal Transduction	Ayu8-104	Crk
	Ayu8-025	pHPS <sub>1</sub> -2
(4) Cell Skeleton	Ayu8-003	dynamin II
2. Cytoplasm		
(1) Translation	Ayu3-022	rRNA
	Ayu8-016	sul1
	Ayu8-016	Upstream region of hnRNP L
	Ayu8-019	Very likely to be RNA polymerase I
(2) Others	Ayu3-001	Mitochondrial DNA
3. Unknown	Ayu7-003	Unknown

#### (4) Confirmation of Gene Disruption by Trapping

**[0036]** It is one of the major points whether endogenous genes have been actually disrupted or not by gene trapping. Thus, the inventors have analyzed the structure of the trap site for 6 known genes. As a result, it was found that the trap vector was inserted into the promoter region in one gene; into an exon in one gene; and into an intron in 4 genes. In all of them, the gene was completely or partially disrupted. Therefore, it has become clear that endogenous genes can be disrupted efficiently by the method of gene trapping of the invention (Fig. 10).

**[0037]** Hereinbelow, the present invention will be described in more detail.

#### 1. Construction of Trap Vectors

**[0038]** Gene trapping is a method for trapping unknown genes on genome utilizing the fact that trap vectors introduced into ES cells are integrated into mouse endogenous genes incidentally and at random. "Gene trapping" means that a trap vector enters into a specific gene on genome and captures that gene. The vector for gene capturing is called "trap vector". Genes have enhancers, promoters, exons, poly(A) sequences, etc. The trap vector is capable of capturing any of them. For this purpose, a trap vector with a structure suitable for the specific capturing may be used.

**[0039]** Generally, exon trap vectors are composed of a reporter gene with a splice acceptor alone, a drug selection marker gene and a plasmid. Only when these vectors are integrated downstream of a mouse endogenous gene, the reporter gene is expressed. This means that it is possible to know the vector's integration into an endogenous gene by monitoring the expression of the reporter gene in the trap vector. If a plasmid such as pUC19 has been linked to the trap vector, the trapped endogenous gene can be isolated by the technique called plasmid rescue. "Plasmid rescue" is a technique for recovering a gene of interest by selection with ampicillin, etc. of those cells transformed with electroporation or the like (Fig. 2E). Furthermore, since the endogenous gene is disrupted at the time of trapping, knockout mice can be produced immediately. Further, since the reporter gene is expressed under the control of the expression regulatory region of the endogenous gene, the tissue specificity and time specificity of the gene can be analyzed easily.

**[0040]** In conventional gene trapping methods, even if a mouse endogenous gene could be disrupted completely, it has been impossible to introduce therein subtle mutations, such as single amino acid substitution, seen in human hereditary diseases. Also, it has been impossible to replace the disrupted mouse gene with a human gene. Toward the solution of these problems, the present invention has modified the Cre-*loxP* system (a bacteriophage-derived recombination system) and utilized it in the trap vector in gene trapping. As a result, it has become possible to insert any gene into a mutant *loxP* site of the trap vector after a mouse gene has been disrupted as a result of the integration of the trap vector. According to the present invention, it has become possible to introduce subtle mutations, such as single amino acid substitution, seen in human hereditary diseases. It has also become possible to replace the trapped gene with a human gene. The trap vector of the invention may be used for trapping various genes. In particular, it may be



used preferably for exon trapping or promoter trapping.

[0041] *loxP* (locus of crossing (X-ing) over, P1) is a 34 bp sequence (5'-ataacttcgata gcatacat tatacgaagttat-3') (SEQ ID NO: 3). The 13 bases at its 5' end (called "inverted repeat sequence 1") and the 13 bases at its 3' end (called "inverted repeat sequence 2") constitute inverted repeat sequences, which are separated by an 8 bp spacer (gcatacat) (Fig. 3). The term "inverted repeat sequences" used herein means that a sequence located on one side of the spacer is complementary to a sequence located on the other side of the spacer in opposite orientation. In other words, the sense strand of one sequence is homologous to the antisense strand of the other sequence in opposite orientation to each other. These two repeat sequences have opposite orientation and, when a double-strand is formed, one same sequence is repeated. Thus, they are called inverted repeat sequences. As shown in Fig. 3, in one strand (for example, the sense strand) of the double-strand, inverted repeat sequence 1 (5'-ataacttcgata-3'; SEQ ID NO: 4) (the left side in Fig. 3) is complementary, in the 5' → 3' direction, to inverted repeat sequence 2 (5'-tatacgaagttat-3'; SEQ ID NO: 5) (the right side in Fig. 3) in the 3' ← 5' direction.

[0042] Unlike ordinary sequences, *loxP* has directionality. Therefore, when the *loxP* sequence is represented in the above-mentioned 5' → 3' direction in the present invention, an arrow pointing the left (e.g. "←") will be included in the representation.

[0043] Cre (causes recombination) means a recombinase that causes genetic recombination and, upon recognition of the above-described repeats, cleaves the spacer in such a manner that "cataca" in the spacer is left as a cohesive end (Fig. 3).

[0044] In bacteria, recombination occurs between two *loxP* sites, and insertion or deletion reaction takes place. If it is possible to cause insertion reaction in mammal cells, then any desired gene can be inserted later. This would dramatically expand the applicability of gene trapping. Actually, since mammal cells have large nuclei, circular DNA molecules with once deleted *loxP* will diffuse and insertion reaction is hardly observed.

[0045] Toward the solution of the above problems, the present inventors have elaborated a method in which mutations are introduced into the *loxP* sequence in order to cause insertion reaction and, once a gene has been inserted into genome, the gene does not undergo deletion (i.e. not removed from the genome). For this method, the inventors have prepared two mutant *loxP* sequences (Fig. 4).

[0046] Briefly, the inventors created one mutant by introducing substitution mutations into one of the inverted repeat sequences of *loxP* (sense strand)(ATAACTTCGTATA; shown at the left in Fig. 4b) so that the mutated sequence becomes TACCGTTTCGTT (underlined portion was changed). This mutant is designated "*lox71*" (SEQ ID NO: 1; Figure 4b). The other mutant was created by introducing substitution mutations into the other inverted repeat sequence of *loxP* (sense strand)(TATACGAAGTTAT; shown at the right in Fig. 4b) so that the mutated sequence becomes TATACGAACGGTA (underlined portion was changed). This mutant is designated "*lox66*" (SEQ ID NO: 2; Figure 4b).

[0047] When recombination has occurred between *lox71* on genome and *lox66* on a plasmid, a *loxP* sequence having mutations in both repeats (designated "*lox71/66*"; TACCGTTTCGTATA GCATACAT TATACGAACGGTA; SEQ ID NO: 6) is located on the 5' side of the inserted DNA (Fig. 4a, see at the left) and a wild-type *loxP* sequence (ATAACTTCGTATA GCATACAT TATACGAAGTTAT; SEQ ID NO: 3) on the 3' side of the inserted DNA (Fig. 4a, see at the left). As a result, Cre no longer can recognize *lox71/66* and thus cannot cause recombination with *loxP*. In the case of homologous recombination between two wild-type *loxP* sequences, a circular DNA containing the excised *loxP* is physically separated. Thus, the reaction tends toward deletion rather than insertion. On the other hand, when *lox71* is used on chromosomes and *lox66* is used on circular DNA molecules, Cre has difficulty in recognizing the *lox71/66* generated as a result of integration of the DNA. Thus, the reaction tends toward insertion rather than deletion, and the inserted state of insertion is maintained (Fig. 5). It should be noted that, in the present invention, *lox66* may be used on chromosomes, and *lox71* may be used on circular DNA molecules.

[0048] Actually, when a mutant *loxP* (hereinafter, sometimes referred to as "mutant *lox*") such as *lox71* has been integrated into ES cells in advance, and a plasmid containing other mutant *loxP* (e.g. *lox66*) is introduced thereto, the plasmid is integrated into the genome. Therefore, if this *lox71*, for example, has been integrated into a gene trap vector in advance, it becomes possible to insert any desired gene later by using *lox66*. Thus, according to the present invention, it has become possible to replace the trapped gene with a gene into which a subtle mutation(s) has (have) been introduced or a human gene.

[0049] Gene trap vectors using this mutant *lox* (*lox71* or *lox66*) may be constructed as described below (see Fig. 6). Here, it should be noted that the following trap vectors are provided only for illustration, not for limitation. Thus, although *lox71* is used as an example of a mutant *lox* in the following vectors, vectors using *lox66* instead of *lox71* are also included in the present invention.

- (a) U8: SP-SA-*lox71*-IRES-M-pA-*loxP*-PV-SP
- (b) U8delta: SP-*lox71*-IRES-M-pA-*loxP*-PV-SP
- (c) pU-Hachi: SA-*lox71*-IRES-M-*loxP*-pA-PV-SP
- (d) pU-12: SA-*lox71*-IRES-M-*loxP*-puro-pA-PV-SP

- (e) pU-15: *lox71*-M-*loxP*-pA-*lox2272*-PV-*lox511*  
 (f) pU-16: *lox71*-IRES-M-*loxP*-pA-*lox2272*-PV-*lox511*  
 (g) pU-17: (*lox71*-integrated SA)-M-*loxP*-pA-*lox2272*-PV-*lox511*  
 (h) pU-18: (*lox71*-integrated SA)-IRES-M-*loxP*-pA-*lox2272*-PV-*lox511*  
 (i) (*lox71*-integrated SA)-M-*loxP*-pA-*lox2272*-promoter-M-*lox511*-SD

**[0050]** In the above-described vector components, SP represents any sequence; SA represents a splice acceptor; SD represents a splice donor; IRES represents an internal ribosomal entry site; M represents a marker gene; *puro* represents puromycin resistance gene; pA represents a poly(A) sequence; and PV represents a plasmid vector.

**[0051]** When trap vectors are integrated into genomic DNA, a part of the vector is deleted in most cases and, as a result, an important part of the vector may be missed. SP is any sequence added as a dummy to prevent such deletion. This sequence may be selected at one's discretion. The length of SP is 100-1000 bp, preferably 300-400 bp. Any known sequence may be used as SP. For example, a part of rabbit  $\beta$ -globin gene may be used.

**[0052]** The splice acceptor means a sequence that can be linked to the 3' end of an exon at the time of splicing.

**[0053]** The splice donor means a sequence that can be linked to the 5' end of an exon at the time of splicing.

**[0054]** IRES, called "internal ribosomal entry site", is a site on ribosome to which aminoacyl t-RNA is bound during protein synthesis (A site), and it is a sequence to allow translation to start in a CAP independent manner.

**[0055]** The marker gene is a gene that serves as a marker to indicate whether the vector of the invention could trap a target gene. Specific examples of marker genes include *E. coli*-derived  $\beta$ -galactosidase gene (*lacZ* gene) or a fusion gene between *lacZ* gene and neomycin (G418) resistance gene ( $\beta$ -*geo* gene), CAT gene, GFP gene, SV40 large T gene, neomycin resistance gene, puromycin resistance gene, hygromycin resistance gene, and blasticidin resistance gene.

**[0056]** The plasmid vector is used after gene trapping to isolate the endogenous gene by plasmid rescue. Plasmid rescue technique is a method for recovering adjacent regions of the plasmid (which is replicable in *E. coli*) integrated in a trap vector using a part of the plasmid. For example, when a genomic DNA segment is linked to the plasmid, a fragment consisting of the plasmid and the genomic DNA segment linked thereto is excised by restriction enzyme treatment. The excised fragment is made circular and introduced into *E. coli*, which is then propagated. As a result, the genomic DNA segment flanking the plasmid can be recovered. Specific examples of the plasmid vector include pBR322, pUC (pUC18, pUC19, pUC118, pUC119, etc.), pSP (pSP64, pSP65, etc.), and pGEM (pGEM-3, pGEM-4, pGEM3Z, etc.). In addition, supF, ampicillin resistance gene, origin of replication, or restriction sites for cloning (e.g. multicloning site) may be linked to the plasmid vector independently or in an appropriate combination.

**[0057]** The vector shown in (a) above is designated "U8". The basic part of U8 (SA-IRES- $\beta$ -*geo*-pA; Fig 7) is derived from pGT1.8IRESbetageo. This pGT1.8IRESbetageo contains mouse *En-2* gene-derived splice acceptor, IRES and  $\beta$ -*geo*. *lox71* is inserted into the *Bgl*II site of this plasmid followed by *Sal*I treatment to thereby provide a *Sal*I fragment. On the other hand, plasmid pEBN-Set1 is prepared by inserting into a vector (such as pUC19) a 180 bp SP sequence, *loxP* and poly(A) signal. The *Sal*I fragment obtained above is inserted into the *Sal*I site of this plasmid to produce U8. Thus, the structure of this trap vector is expressed as follows (from the 5' end, in this order): any sequence, splice acceptor, *lox71*, IRES,  $\beta$ -*geo*, pA, *loxP*, pUC19, and any sequence (Fig. 7).

**[0058]** The vector shown in (b) above is designated "U8delta". U8delta is obtainable by deleting the splice acceptor from U8. This vector has a structure in which *lox71* is linked before the reporter  $\beta$ -*geo* and *loxP* after  $\beta$ -*geo*. This vector was given such a structure because the intermediate IRES and  $\beta$ -*geo* can be removed completely by transiently expressing Cre after the vector has been integrated. As a result, plasmid pUC is located close to the mouse endogenous gene which was located upstream of the plasmid. Thus, the mouse endogenous gene can be isolated easily.

**[0059]** The vector shown in (c) above is designated "pU-Hachi". This vector is composed of SA-*lox71*-IRES-M-*loxP*-pA-PV-SP. pU-Hachi vector is derived from pGT1.8IRES  $\beta$ -*geo*, and contains SA sequence from mouse *En-2* gene and  $\beta$ -*geo* sequence linked to encephalomyocarditis virus-derived IRES sequence. A *Bam*HI fragment of *lox71* is inserted into the *Bgl*II site of pGT1.8IRES  $\beta$ -*geo*. Then, a plasmid was constructed by inserting an SP sequence, a *loxP* sequence, and poly A addition signal from mouse phosphoglycerate kinase-1 (PGK) into a modified vector from which *lacZ* sequence has been removed. The SP sequence is used to protect the 3' end of the trap vector. pU-Hachi is obtainable by inserting a *Sal*I fragment of SA-IRES-*lox71*- $\beta$ -*geo* into the *Sal*I site of the above plasmid.

**[0060]** The vector shown in (d) above is designated "pU-12". This vector is composed of SA-*lox71*-IRES-M-*loxP*-*puro*-pA-PV-SP. In order to construct this pU-12 trap vector, first, the PGK poly(A) signal of pE3NSE7 is replaced with puromycin resistance gene + PGK poly(A) signal. Then, *lox511* is inserted into the *Bgl*II site downstream thereof. Then, a *Sal*I fragment of SA-IRES-*lox71*- $\beta$ -*geo* from pU-Hachi is inserted into the restriction site of the resultant plasmid to thereby obtain pU-12.

**[0061]** The vector shown in (e) above is designated "pU-15". This vector is composed of *lox71*-M-*loxP*-pA-*lox2272*-PV-*lox511*. "*lox2272*" is a mutant *loxP* in which the spacer sequence (gcatacat) is changed to ggatactt (i.e. the second base "c" has been changed to "g", and the seventh base "a" to "t"). "*lox511*" is a mutant *loxP* in which the

spacer sequence (gcatacat) is changed to gtatacat (i.e. the second base "c" has been changed to "t"). Since *lox511* and *lox2272* have mutations in the spacer, they do not cause recombination with other *loxP* sequences such as wild-type *loxP* or *lox71*, though two *lox511* sequences or *lox2272* sequences cause recombination with each other. The order of *lox2272* and *lox511* in the vector may be changed. Either one may come first. (This will apply to other vectors using these mutants.)

[0062] The vector shown in (f) above is designated "pU-16". This vector is composed of *lox71*-IRES-M-*loxP*-pA-*lox2272*-PV-*lox511*, and is obtainable by inserting IRES between *lox71* and  $\beta$ -geo of pU-15.

[0063] The vector shown in (g) above is designated "pU-17". In this vector, *lox71* is integrated in a region of SA. This vector may be constructed as follows. Briefly, a plasmid is constructed by inserting *lox511*, *loxP*, PGK poly(A) signal and *lox2272* into, for example, pSP plasmid. Then, *lox71* is inserted into SA in pU-Hachi followed by insertion of  $\beta$ -geo in this order. This plasmid is ligated to the plasmid constructed above to thereby obtain pU-17.

[0064] The vector shown in (h) is designated "pU-18". Like pU-17, this vector also has *lox71* integrated in SA. pU-18 is obtainable by inserting IRES between SA and  $\beta$ -geo of pU-17.

[0065] The vector shown in (i) is composed of (*lox71*-integrated SA)-M-*loxP*-pA-*lox2272*-promoter-M-*lox511*-SD. This vector is obtainable by inserting a promoter and M in this order into pU-17 instead of PV and ligating SD after *lox511*. This vector has a promoter added thereto. This promoter is not particularly limited. Any promoter may be used. For example, bacteria- or yeast-derived promoters described later in the section of transformant preparation; RNA polymerase promoters such as SP6 RNA polymerase promoter, T7RNA polymerase promoter, T3RNA polymerase promoter; or mammal-derived promoters such as EF1 (elongation factor 1) promoter, PGK (glycerophosphate kinase) promoter, MCI (polyoma enhancer/herpes simplex thymidine kinase) promoter may be enumerated.

## 2. Gene Trapping

[0066] Two-step gene trapping is performed using the vector prepared as described above.

[0067] The first step is conventional gene trapping. "Conventional gene trapping" means to introduce the above trap vector into ES cells and to trap an endogenous gene present inherently in the ES cells. By these procedures, the endogenous gene in the ES cells is disrupted. Using these ES cells, the knockout mice described later can be prepared. After isolation of the trapped endogenous gene (Fig. 8; "gene X"), subtle mutations are introduced into this gene in *E. coli* using site-specific mutagenesis or the like (Fig. 8; "gene X'"). For the introduction of mutations into gene X, known techniques such as Kunkel method, gapped duplex method, etc. and methods based on these techniques may be used. For example, mutations are introduced by using a mutagenesis kit utilizing site-specific mutagenesis (e.g. Mutant-K or Mutant-G available from Takara Shuzo) or LA PCR *in vitro* Mutagenesis series kit (Takara Shuzo).

[0068] The second step gene trapping means to introduce into ES cells the mutated endogenous gene (gene X') ligated downstream of *lox66*. By these procedures, recombination occurs between the *lox71* site of the trap vector introduced in the first step and the *lox66* site of the vector introduced in the second step. As a result, the modified gene can be introduced into ES cells in the form of a cassette composed of [(*lox71/66*)-(gene X')-(*loxP*)] (Fig. 8).

[0069] According to these procedures, not only modified endogenous genes but also human genes may be introduced. Any gene may be introduced. In the present invention, this method is designated exchangeable gene trapping.

## 3. Screening for Trap Vector-Integrated Clones (ES Cells)

[0070] If a gene trap vector was introduced into ES cells and then neomycin resistant clones have been selected from the resultant cells, these clones are considered to have the trap vector integrated downstream of a mouse endogenous gene. DNA is extracted from these clones and analyzed by Southern blotting, to thereby select clones in which a single copy of the trap vector is integrated. The inventors have found that this selection method enables efficient selection of mouse gene-trapping clones. Therefore, this will be used as a screening system in the present invention.

### (I) Isolation of Neomycin Resistant Clones

[0071] In the present invention, electroporation, microinjection or the like is used for introducing trap vectors into ES cells. For example, 100  $\mu$ g of trap vector is introduced into  $3 \times 10^7$  TT2 ES cells suspended in 0.8 ml of phosphate buffer by electroporation (using a BioRad GenePulser at 800 V and 3  $\mu$ F), and the resultant cells are cultured in the presence of G418 (concentration: 200  $\mu$ g/ml). After 1 week, neomycin resistant clones are isolated.

[0072] The gene trap vector is integrated into the ES cell genome at random. Therefore, mere introduction of the trap vector into ES cells does not necessarily mean integration into a gene. The vector may be integrated into a non-gene region. However, since the trap vector contains a drug resistance gene *neo* (neomycin resistance gene), those cells expressing this gene are neomycin (also called G418) resistant. In other words, those cells that survive in the presence of neomycin are expressing neomycin resistance gene. The neomycin resistance gene in the trap vector is expressed

only when integrated downstream of a mouse gene which is being expressed in the ES cells. Thus, the expression of this neomycin resistance gene means that it has been integrated downstream of a certain gene.

## (2) Selection of ES Clones by Integration Pattern

**[0073]** DNA is extracted from ES clones by conventional methods, and integration patterns are analyzed by Southern blotting or the like. When the Southern blot pattern appears as a single band, it can be judged that only one copy of the vector is integrated. Therefore, the DNA expressing that pattern is selected. These procedures are performed in order to select those clones in which isolation of mouse endogenous genes by plasmid rescue will be easy. Also, those clones which have become neomycin resistant with only one copy of the vector are trapping mouse endogenous genes at an extremely high probability.

## 4. Establishment of Trap Lines (Transgenic Animals) by Production Of Chimeric Animals

**[0074]** Chimeric animals are produced by standard methods (Fig. 9). The species of chimeric animals produced in the present invention is not particularly limited. For example, mouse, rat, guinea pig, rabbit, goat, sheep, pig, dog or the like may be enumerated. In the present invention, mouse is preferable because of its easy handling and propagation.

**[0075]** ES cells selected with neomycin are aggregated with animal derived morulae (i.e. aggregates of ES cells and morulae are formed) to prepare chimeric animal embryos (e.g. those developed to blastocysts). The resultant embryo is transferred into the uterus of a foster female animal that has been brought into a pseudo-pregnant state by mating with a sterile male animal. If the animal is mouse, offspring will be born about 17 days after this transfer. Chimeric animals are selected from the offspring animals. Although those that have a high contribution of chimerism are likely to be germline chimeric animals, this can be confirmed by crossing such chimeric animals with normal animals.

**[0076]** Subsequently, chimeric animals are crossed with normal female animals to obtain F1 to thereby establish mutant animal lines. The following analysis is conducted only for those animals that have been established as trap lines (transgenic animals). Further, spermatozoa from F1 and two-cell stage embryos obtained by *in vitro* fertilization using the spermatozoa can be stored frozen by ultra-quick freezing technique.

### (1) Analysis of Expression Patterns

**[0077]** F1 animals are crossed and then expression patterns in embryos (in the case of mouse, 9.5-day embryos) and adult animals are analyzed.

### (2) Analysis of Phenotypes

**[0078]** For each of the established animal lines, phenotypes of heterozygous and homozygous animals are analyzed. This analysis is carried out by macroscopic observation, internal observation by anatomy, microscopic examination of tissue sections from each organs, examination of the skeletal system by X-ray photography, examination of behavior and memory, and blood examination.

### (3) Isolation and Structural Analysis of the Trapped Gene and Preparation of Chromosome Map

**[0079]** Trapped DNA is isolated from the trap clone, and the nucleotide sequence thereof is determined (as described later). Then, homology search is performed using the sequence information obtained. Consequently, the sequence of the trapped DNA is classified into one of the groups of known genes, ESTs (expressed sequence tags), unknown genes or repeats. If the DNA is an EST or unknown gene, a chromosome map can be prepared. Chromosome maps may be prepared by fluorescent *in situ* hybridization (FISH), association analysis using microsatellite probes or the like, or analysis of hybrid cells by irradiation. Once the position of the DNA on the chromosome has been determined, this position is compared with the positions of mutant genes in existing mutant mice to examine if the relevant position coincides with one of them.

### (4) Construction of Database

**[0080]** For each of the established lines, database is prepared on expression patterns of the marker gene in embryos (in the case of mouse, 10-day embryos) and adult animals; phenotypes in F1 and F2 animals; the nucleotide sequence of the trapped endogenous DNA and, if the DNA is an EST or unknown gene, its position in the chromosome.

## 5. Knockout Animals

[0081] The knockout animal of the invention is an animal that has been treated so that the function of a specific gene is lost. The procedures of such treatment will be described below.

[0082] The animals that may be used in the present invention include mouse, rat, guinea pig, rabbit, goat, sheep, pig and dog. Preferably, mouse is used in the invention because of its easy handling and propagation.

[0083] A genomic DNA fragment containing an unknown gene is obtained by PCR from a genomic DNA prepared from animal ES cells or obtained from a genomic library. Then, this fragment is integrated into the trap vector of the invention. As a result of this operation, the function of the exons in the unknown gene is destroyed. In the trap vector, thymidine kinase (*tk*) gene or diphtheria toxin (DT) gene has been ligated in advance for negative selection. This trap vector is introduced into ES cells by electroporation or the like. The resultant cells are cultured in the presence of neomycin for positive selection and a nucleic acid analogue FIAU (fluoriodoadenosyluracil) or diphtheria toxin for negative selection. Through these selections, only the trap vector-integrated ES cells remain. In these ES clones, the genes containing disrupted exons are knocked out. The resultant cells are transferred into the uterus of foster female animals. Then, chimeric animals are selected from offspring animals. By crossing these chimeric animals with normal animals, heterozygous animals are obtained. Then, homozygotes can be obtained through crossing between the heterozygotes.

[0084] In order to confirm that a knockout mouse is obtained, F1 mice are X-ray photographed and examined for bone abnormalities (e.g. changes in shape). Alternatively, this confirmation may be made by observing the presence or absence of abnormalities in the appearance of mice and by observing abnormalities in various tissues and organs at the time of anatomy. Also, the confirmation may be made by extracting RNA from tissues and analyzing the expression pattern of the relevant gene by Northern blotting. If necessary, blood samples may be taken and subjected to blood examination and serum biochemical examination.

## 6. Isolation of Genes, Construction of Recombinant Vectors and Preparation of Transformants

## (1) Isolation of Genes

[0085] In the present invention, genes trapped as described above can be cloned and structurally analyzed.

[0086] Isolation of DNA from the trap clone may be performed by conventional techniques. For example, if cloning is performed using mRNA from the trap clone, first, total RNA is obtained from the trap clone by treating the clone with guanidine reagent, phenol reagent or the like. From the total RNA, poly(A<sup>+</sup>) RNA (mRNA) is obtained by affinity column method using, for example, oligo dT-cellulose or poly U-Sepharose containing Sepharose 2B as a carrier, or by batch method. Using this mRNA as a template, single-stranded cDNA is synthesized using oligo dT primers and a reverse transcriptase. Then, double-stranded cDNA is synthesized from the single-stranded cDNA. The thus obtained double-stranded cDNA is inserted into an appropriate expression vector (e.g.  $\lambda$  gt11) to thereby obtain a cDNA library.

[0087] The gene obtained as described above is subjected to sequencing. The sequencing may be performed by known techniques such as the chemical modification method of Maxam Gilbert or the dideoxy nucleotide chain termination method using DNA polymerase. Usually, the nucleotide sequence of the gene can be determined using an automated sequencer. When the 5' region or 3' region of the relevant cDNA is undetermined, the entire nucleotide sequence is determined by 5'-RACE or 3'-RACE. RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) is a well-known technique in the art (Frohman, M.A. *et al.*, *Methods Enzymol.* Vol. 218, pp. 340-358 (1993)), and kits for performing RACE are commercially available (e.g. Marathon<sup>TM</sup> cDNA Amplification Kit; Clontech). Once the nucleotide sequence of the gene of the invention has been determined, the gene can be obtained by chemical synthesis or PCR using primers synthesized based on that sequence.

## (2) Construction of Recombinant Vectors

[0088] A gene fragment of interest is purified and ligated to vector DNA. As the vector, any vector may be used such as phage vector or plasmid vector. The technique to ligate DNA of interest to vectors is well known in the art (J. Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Further, recombinant vectors are prepared from the resultant vector and introduced into *E. coli* or the like. Then, appropriate colonies are selected to prepare desired recombinant vectors.

## (3) Transformants

[0089] The transformant of the invention can be obtained by introducing the recombinant vector of the invention into a host in such a manner that the gene of interest can be expressed. The host is not particularly limited as long as it

can express the DNA of the invention. Specific examples of the host include bacteria, yeast, animal cells and insect cells.

[0090] When a bacterium such as *E. coli* is used as the host, it is preferred that the recombinant vector of the invention be capable of autonomous replication in the bacterium and yet be composed of a promoter, a ribosome binding sequence, the gene of the invention, and a transcription termination sequence. A gene that controls the promoter may also be included. Specific examples of *E. coli* include *Escherichia coli* K12 and DH1, and specific examples of *Bacillus* include *Bacillus subtilis*. As the promoter, any promoter may be used as long as it can direct the expression of the gene of interest in the host such as *E. coli*. For example, *E. coli*- or phage-derived promoters such as *trp* promoter, *lac* promoter, PL promoter and PR promoter may be used. An artificially designed and modified promoter such as *tac* promoter may also be used. As a method for introducing the recombinant vector into a host bacterium, any method for introducing DNA into bacteria may be used. For example, the method using calcium ions (Cohen, S.N. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69:2110-2114 (1972)), electroporation (Becker, D.M. *et al.*, *Methods. Enzymol.*, 194:182-187 (1990) or the like may be used.

[0091] When yeast is used as the host, *Saccharomyces cerevisiae*, *Shizosaccharomyces pombe* or the like may be used. As the promoter, any promoter may be used as long as it can direct the expression of the gene of interest in yeast. For example, *gal* promoter, *gal10* promoter, heat shock protein promoter, MF  $\alpha$  1 promoter, PH05 promoter, PGK promoter, GAP promoter, ADH promoter and AOX1 promoter may be enumerated. As a method for introducing the recombinant vector into yeast, any method for introducing DNA into yeast may be used. For example, electroporation, the spheroplast method (Hinnen, A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:1929-1933 (1978), the lithium acetate method (Itoh, H., *J. Bacteriol.*, 153:163-168 (1983) or the like may be used.

[0092] When an animal cell is used as the host, COS cells, Vero cells, Chinese hamster ovary cells (CHO cells), mouse myeloma cells or the like may be used. As the promoter, SR  $\alpha$  promoter, SV40 promoter, LTR promoter, EF1 promoter, PGK promoter, MC1 promoter, or the like may be used. Alternatively, human cytomegalovirus early gene promoter or the like may be used. As a method for introducing the recombinant vector into an animal cell, electroporation, the calcium phosphate method, lipofection, or the like may be used.

[0093] When an insect cell is used as the vector, Sf9 cells, Sf21 cells or the like may be used. As a method for introducing the recombinant vector into an insect cell, the calcium phosphate method, lipofection, electroporation, or the like may be used.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

##### [0094]

Fig. 1 is a diagram showing the concept of structural analysis in both gene region and non-gene region.

Fig. 2 is a diagram showing an outline of the construction of a trap vector and the gene trapping according to the invention.

Fig 3 is a diagram showing the structure of *loxP*.

Fig. 4 is a diagram showing recombination between *lox71* and *lox66*.

Fig. 5 is a diagram showing insertion of a DNA fragment when mutant *loxP* sequences are used.

Fig. 6 is a diagram showing trap vectors of the invention.

Fig. 7 is a flow chart showing the construction of a trap vector pU-Hachi.

Fig. 8 is a diagram showing the two-step exchangeable gene trapping of the invention.

Fig. 9 is a diagram showing an outline of the establishment of trap lines by production of chimeric animals.

Fig. 10 is a diagram showing various positions of integration of trap vectors.

Fig. 11 is a photograph showing a bending mutation in the tailbone in mouse.

#### BEST MODES FOR CARRYING OUT THE INVENTION

[0095] Hereinbelow, the present invention will be described in more detail with reference to the following Examples. It should be noted that the technical scope of the present invention is not limited by these Examples.

##### EXAMPLE 1: Construction of Varied-Type Gene Trap Vectors

###### (1) Construction of pU-Hachi Trap Vector

[0096] pU-Hachi vector is derived from pGT1.8IRES  $\beta$ -geo, and contains SA sequence from mouse *En-2* gene and  $\beta$ -geo sequence linked to encephalomyocarditis virus-derived IRES sequence. First, a *Bam*HI fragment of *lox71* is inserted into the *Bgl*II site of pGT1.8IRES  $\beta$ -geo. Then, plasmid pEBN-SE7ti was constructed by inserting a 180 bp (SP) s quence (which is a part of rabbit  $\beta$  globin gene), *loxP* sequence, and poly A addition signal from mouse phos-

phoglycerate kinase-1 (PGK) into a modified vector pUC19 from which *lacZ* sequence has been removed. The SP sequence was used to protect the 3' end of the trap vector. By inserting a *SaI* fragment of SA-IRES-*lox71*- $\beta$ -*geo* into the *SaI* site of pEBN-SE7li, pU-Hachi was obtained.

## 5 (2) Construction of pU-12 Trap Vector

[0097] In order to construct pU-12 trap vector, first, the PGK poly(A) signal of pE3NSE7 was replaced with puromycin resistance gene + PGK poly(A) signal. Then, *lox511* was inserted into the *Bgl*II site downstream thereof to prepare a plasmid. By inserting a *SaI* fragment of SA-IRES-*lox71*- $\beta$ -*geo* from pU-Hachi into the *SaI* site of the above plasmid, pU-12 was obtained.

## (3) Construction of pU-17 Trap Vector

[0098] First, *lox511*, *loxP*, PGK poly(A) signal and *lox2272* were inserted in this order into plasmid pSP73 (Promega) to construct pSP5PP2. Subsequently, pU-Hachi was cleaved at one of the two *Bam*HI sites within SA located upstream of the other. The DNA fragment of pU-Hachi up to the upstream *Bam*HI site in SA, *lox71* sequence, the DNA fragment of pU-Hachi from the downstream *Bam*HI site in SA to the *Kpn*I site, and a *Nco*I-*SaI* fragment of  $\beta$ -*geo* were inserted in this order into pBluescriptII KS+ plasmid to construct pKS+S71A  $\beta$  *geo*. From this plasmid, an *Xba*I fragment of SA- $\beta$ -*geo* containing *lox71* was excised and inserted into the *Spe*I site of pSP5PP2 to thereby obtain pU-17.

## 20 EXAMPLE 2: Selection of ES Cell Clones

[0099] In the electroporation using pU-Hachi trap vector, 100  $\mu$ g of *Spe*I-digested DNA and  $3 \times 10^7$  cells were used. Cells were suspended in 0.8 ml of PBS and electroporated using a BioRad GenePulser at 800 V and 3  $\mu$ F. After 48 hours, the cells were cultured in the presence of 200  $\mu$ g/ml G418. This selection was maintained for 7 days. The resultant colonies were plated on 24-well plates for propagation and stored frozen. Trap clones were analyzed by Southern blotting to select those cell strains that exhibit patterns of single copy integration.

[0100] In order to remove  $\beta$ -*geo* sequence from the trap clone, pCAGGS-Cre (Araki, K. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:160-164, 1995; Araki, K. *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 25:868-872, 1997; Araki, K. *et al.*, *J. Biochem. Tokyo*, 122: 977-982, 1997) was electroporated in a circular form. This electroporation was carried out under the same conditions as described above except that the number of cells was  $1.5 \times 10^7$  and that the PBS volume was 0.4 ml.

[0101] One half of the thus treated cells were plated onto a 100 mm plate and grown for 48 hours. Then, the cells were re-plated onto 100 mm plates at  $1 \times 10^3$  cells per plate for colony formation. After 1 week, colonies were picked up and expanded for DNA preparation.

[0102] For the co-electroporation experiments designed for targeted integration into the *lox71* site of the trap vector, 20  $\mu$ g of each targeting plasmid (p66<sup>2</sup>IEGPPac, p66<sup>2</sup>INZPPac or p66PGKPac-5) and pCAGGS-Cre were used in circular forms.

[0103] Plasmid p66PGKPac-5 was constructed by inserting a *lox66* fragment and PGK promoter-puromycin resistance gene coding sequence into pSP73 vector (Promega). Plasmid p66<sup>2</sup>IEGPPac was constructed from pSP73 vector (Promega), IRES sequence, EGFP gene (Clontech), PGK promoter, *Pca* gene and *lox66* sequence. Plasmid p66<sup>2</sup>INZPPac was constructed by replacing the PGK gene in p66<sup>2</sup>IEGPPac with a *lacZ* gene fused to SV40 large T gene-derived nuclear localization signal.

[0104] Cells suspended in PBS ( $1 \times 10^7$  cells/0.8 ml) were electroporated at 200 V and 950  $\mu$  F. After 48 hours, the cells were subjected to selection with puromycin at 2  $\mu$ g/ml for 3 days. Then, the cells were transferred into a normal medium. Nine days after the electroporation, colonies were picked up and expanded.

[0105] Embryoid bodies (EBs) were produced according to a known method (Abe, K., Niwa, H. *et al.*, *Exp. Cell Res.* 229: 27-34, 1996).  $\beta$ -galactosidase activity in ES cells and EBs was determined by staining with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactopyranoside (X-gal) as described (Glossler, A. and Zachgo, J., *Gene Targeting: A Practical Approach*, Joyner, A. (ed.), Oxford University Press, Oxford, 1993, pp. 181-227).

[0106] Trap vector pU-Hachi was linearized and introduced into TT2 ES cells. As a result, 109 clones were isolated. Genomic DNA was prepared from each clone and subjected to Southern blotting using a pUC probe and at least 3 restricting enzymes to examine trap vector-integration patterns.

[0107] A single band was confirmed in 69% of the clones. Since the presence of *lox71* site is essential for the Cre-mediated integration, the presence was confirmed by Southern blotting using a *lacZ* probe and *Pst*I digestion. As a result, it was found that *lox71* was deleted in 10% of the clones (Table 4). The remaining 59% of the clones in which a single copy was integrated and yet *lox71* site was maintained were selected for further analysis.

Table 4

	Single copy integration (%)			Multi-copy integration (%)	
	Clones retaining lox71 site		Clones without lox71 site		
Total No. of clones tested (%)	Retaining plasmid replication origin	Without plasmid replication origin		2-3 copies	≥ 5 copies
109 (100)	24 (22)	40 (37)	11 (10)	26 (24)	8 (7)

**[0108]** In order to evaluate the capture of endogenous genes by the trap vector, cells were stained with X-gal before and after the formation of embryoid bodies. As shown in Table 5, 97% of the tested clones exhibited  $\beta$ -gal activity at a specific stage in differentiation. This means that pU-Hachi trap vector performs effective gene trapping comparable to the trapping of other IRES-  $\beta$ -geo vectors.

Table 5

Clone No. (%)	Expression of $\beta$ -geo	
	Undifferentiated ES Cells	Differentiated EBs (Day 8)
26(41)	+	+
32(50)	-	+
4(6)	+	-
2(3)	-	-

#### EXAMPLE 3: Selection Frequency of Clones

**[0109]** In order to select those clones in which a single copy of the trap vector was integrated, DNA was extracted from the selected, neomycin resistant clones and analyzed by Southern blotting.

**[0110]** Briefly, cells were lysed with SDS/proteinase K, treated with phenol/chloroform (1:1, vol:vol) twice, precipitated with ethanol, and then dissolved in TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5/1 mM EDTA). Six micrograms of genomic DNA was digested with appropriate restriction enzymes, electrophoresed on 0.9% agarose gel and then blotted onto a nylon membrane (Boehringer Mannheim). Hybridization was performed using a DIG DNA Labeling and Detection Kit (Boehringer Mannheim).

**[0111]** For PCR analysis, DNA was subjected to 28 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 2 min and extension at 72°C for 2 min in the reaction solution described below.

**[0112]** The primers used in the PCR were as follows:

$\beta$ -geo detection primers

**Z1 (forward):** 5'-gcgttacccaacttaatcg-3' (SEQ ID NO: 7)

**Z2 (reverse):** 5'-tgtgagcgagtaacaacc-3' (SEQ ID NO: 8)

Primers for detecting the replication origin region in pUC vector

**Ori2 (forward):** 5'-gccagtggcgataagtcgtgtc-3' (SEQ ID NO: 9)

**Ori3 (reverse):** 5'-cacagaatcaggggataacgc-3' (SEQ ID NO: 10)



Reaction Solution	
10 x PCR buffer	2 $\mu$ l
10 mM dNTP	0.2 $\mu$ l
Forward primer (100 pmol/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l
Reverse primer (100 pmol/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l
AmpliTaQ DNA polymerase (Perkin Elmer)	0.2 $\mu$ l
Total Volume (adjusted with sterilized distilled water)	20 $\mu$ l

[0113] One half of the resultant PCR product was loaded onto agarose gel and analyzed.

[0114] Plasmid rescue (i.e. recovery of the trapped gene) was performed as described below.

[0115] Briefly, genomic DNA (20  $\mu$ g) was digested with appropriate restriction enzymes and ligated in a reaction volume of 400  $\mu$ l to obtain circular molecules. After phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation, the DNA was suspended in 10  $\mu$ l of TE. Using one half of this DNA suspension, *E. coli* (STBL2; Life Technologies) was transformed by electroporation. The electroporation was performed according to the manual of BioRad GenePulser. The electroporated cells were incubated in 1 ml of Circle Grow medium (BIO 101) at 30°C for 1 hour under agitation. Then, after concentration, the sample was plated on LB/agar plates followed by selection of plasmids with ampicillin. The rescued plasmids were analyzed by restriction mapping and sequencing. Nucleotide sequences were determined with Thermo Sequenase Fluorescent-Labeled Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham).

[0116] As a result, as shown in Table 6, clones in which recombination occurred at a high frequency could be obtained.

Table 6

Trap Clone	No. of subclones analyzed	No. of subclones in which recombination occurred	Recombination frequency (%)	Length of the 5' flanking region obtained by plasmid rescue (kb)	Length of the 3' flanking region obtained by plasmid rescue (kb)
Ayu8-003	23	15	65	75	53
Ayu8-016	20	2	10	3.8	4.5
Ayu8-025	23	16	70	1.8	6.5
Ayu8-104	12	5	42	3.5	7
Ayu8-108	12	6	50	5	6

#### EXAMPLE 4: Production of Chimeric Mice and Gene Analysis

##### (1) Introduction of the Clone into Mice

[0117] The trap ES clone was aggregated with ICR mouse-derived 8 cell stage embryos and cultured overnight. On the next day, aggregates of the ES cell and embryo that had developed to blastocysts were selected. Approximately 20 of these chimeric embryos were transferred into the uterus of a foster female mouse that was pre-mated with a sterile male mouse. Offspring mice were born about 17 days thereafter. Eight weeks after birth when they became sexually mature, these chimeric mice were crossed with normal female mice to obtain ES clone-derived F1 mice.

##### (2) Analysis of Phenotypes

[0118] The F1 mice were X-ray photographed, and the presence or absence of abnormalities in the bone was observed.

##### (3) Analysis of the Trapped Gene

[0119] Since the trapped gene must be forming a fusion mRNA with  $\beta$ -geo, the trapped gene was identified utilizing this presumption.

[0120] Briefly, mRNA was extracted from X-gal staining-positive tissues of F1 mice. From the resultant mRNA, single-

stranded cDNA was synthesized with a ThermoScript RT-PCR system (GIBCO BRL) using sequences within the SA as primers. Subsequently, a cDNA fragment corresponding to the upstream region of the trapped gene that was linked to the exon of the SA in the vector was obtained using a 5'RACE system (GIBCO BRL). The resultant cDNA fragment was cloned into a plasmid vector and subjected to sequencing.

#### (4) Results

[0121] Table 7 shows one example of the results obtained from the analysis of trapped genes.

Table 7

	Clone No.	Gene	Phenotype
1	Ayu8-R38	Sp1	
2	Ayu8-029	PCM1 (pericentriol material 1)	
3	Ayu3-008	Cyclin B2	
4	Ayu6-003	Homologue to the <i>E. coli</i> Ftsj1 gene	
5	Ayu8-003	dynamain II	Death at embryonic stage
6	Ayu8-R16	suil	
7	Ayu8-016	Upstream region of hnRNP L	
8	Ayu8-019	RNA polymerase I	
9	Ayu8-108	importin $\beta$	
10	Ayu8-021	Unknown	Kinky tail

[0122] Among the genes obtained as described above, PCM1 gene was analyzed. As a result, sequences shown in SEQ ID NOS: 11 to 13 (5'RACE partial fragments) were obtained. These sequences matched with a part of the known PCM1 gene. Further, the mice obtained from Ayu8-021 clone exhibited a mutation of bending in the tail bone (kinky tail) (Fig. 11). This mutant gene fragment was sequenced to thereby obtain the sequence as shown in SEQ ID NO: 14.

[0123] All of the publications, patents and patent applications referred to in the present specification are incorporated herein by reference in their entirety.

#### INDUSTRIAL APPLICABILITY

[0124] The present invention provides gene trap vectors and a method of gene trapping. According to the present invention, first, (1) knockout mice can be produced efficiently. In most cases, mouse genes are knocked out by the integration of the trap vector into genes. Therefore, if the trap vector-introduced ES cells are used, a mouse gene-knocked out mice can be produced. That is, knockout mice can be produced efficiently by selection of neomycin resistant clones and selection of those clones in which a single copy of the trap vector is integrated. According to conventional homologous recombination methods, one researcher can produce only 4 lines of knockout mice in one year at his/her best. According to the method of the invention, however, one researcher can establish as many as 240 lines in one year if, for example, he/she establishes 6 lines per week and works 40 weeks a year. Thus, the method of the invention is 60 times more efficient than conventional methods.

[0125] (2) The method of the invention allows detailed analysis of gene functions.

[0126] In the method of gene trapping of the invention, it is possible to introduce mutations in advance into each part of a gene that seems to have a certain function, and integrate the resultant mutant genes into trap vectors. Then, the mutant gene-integrated trap vector can be introduced into mouse followed by analysis of the phenotype.

[0127] (3) The method of the invention allows the production of disease model mice which are closer to human.

[0128] According to the present invention, it is possible to create disease model mice which are closer to human than conventional models because a human gene having the same mutation as found in a human disease can be introduced into mice replacing the corresponding mouse gene.

SEQUENCE LISTING FREE TEXT

[0129]

5 SEQ ID NO: 1: synthetic DNA  
 SEQ ID NO: 2: synthetic DNA  
 SEQ ID NO: 3: synthetic DNA  
 SEQ ID NO: 4: synthetic DNA  
 SEQ ID NO: 5: synthetic DNA  
 10 SEQ ID NO: 6: homologous recombination sequence  
 SEQ ID NO: 7: synthetic DNA  
 SEQ ID NO: 8: synthetic DNA  
 SEQ ID NO: 9: synthetic DNA  
 SEQ ID NO: 10: synthetic DNA

REFERENCES

[0130]

20 (1) Relating to Gene Trapping:

- 1)Wurst,W. et al., Genetics 139: 889-899,1995.
- 2)Chowdhury,K. et al., Nucleic Acids Res. 25:1531-1536, 1997.
- 3)Hicks, G. G. et al., Nature Genetics 16: 338-344,1997.
- 25 4)Zambrowicz, B. P. et al., Nature 392: 608-611,1998.

(2) Relating to the Cre-loxP System

- 1)Sauer, B. and Henderson, N. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5166-5170, 1988.
- 30 2)Lakso, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6232-6236, 1992,
- 3)Gu,H. et al., Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced 1993.
- 4)Albert, H. et al., Plant J. 7: 649-659, 1995.
- 5)Schwenk, F. et al., Nucleic Acids Res. 23: 5080-5081, 1995.

35 (3) List of References relating to Gene Trapping

- 1)Miyazaki, J. et al., Gene 79: 269-277, 1989.
- 2)Niwa, H. et al., Gene 108: 193-200, 1991.
- 40 3)Niwa, H. et al., J. Biochem, 113: 343-349, 1993.
- 4)Niwa, H. et al., Gene 169: 197-201, 1996,
- 5)Abe, K.,Niwa,H. et al., Exp. Cell Res. 229: 27-34, 1996.
- 6)Araki, K. et al., Nucleic Acid Res. 25: 868-872, 1997.
- 7)Araki, K. et al., J. Biochem. 122: 977-982, 1997.
- 45 8)Oike, Y. et al., Human Mol. Genet-In Press
- 9)Oike, Y. et al., Blood in press

50

55

SEQUENCE LISTING

5           <110> TRANSGENIC INC.

10           <120> TRAPVECTOR

            <130> PH-976PCT

15           <150> JP99/200997

            <151> 1999-07-14

20           <160> 12

25           <170> PatentIn Ver. 2.0

            <210> 1

30           <211> 13

            <212> DNA

            <213> Artificial Sequence

35           <220>

            <223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

40           <400> 1

            taccgttcgt ata 13

45           <210> 2

            <211> 13

50           <212> DNA

            <213> Artificial Sequence

55           <220>

	<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA	
5	<400> 2	
	tatacgaacg gta	13
10	<210> 3	
	<211> 34	
15	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
20	<220>	
	<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA	
25	<400> 3	
	ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttat	34
30	<210> 4	
	<211> 13	
	<212> DNA	
35	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
40	<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA	
	<400> 4	
45	ataacttcgt ata	13
50	<210> 5	
	<211> 13	
	<212> DNA	
55	<213> Artificial Sequence	

5	<220>	
	<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA	
10	<400> 5	
	tatacgaagt tat	13
15	<210> 6	
	<211> 34	
	<212> DNA	
20	<213> Other	
	<220>	
25	<223> Homologous recombination sequence	
	<400> 6	
30	taccgttcgt atagcataca ttatacgaac ggta	34
	<210> 7	
35	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
40	<220>	
	<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA	
45	<400> 7	
	gcgttacca acttaatcg	19
50	<210> 8	
	<211> 18	
	<212> DNA	
55	<213> Artificial Sequence	

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

5

<400> 8

10

tgtgagcgag taacaacc

18

<210> 9

15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

25

<400> 9

30

gccagtggcg ataagtcgtg tc

22

<210> 10

35

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

45

<400> 10

50

cacagaatca ggggataacg c

21

<210> 11

55

<211> 400

<212> DNA

<213> Mus musculus

5 <400> 11  
 agaaacttaa acagcggata aacttcagtg atttanatca gagaagtatt ggaagtgatt 60  
 ctcaagggtan agcaacagcg gctaacaaca aacgtcagct tagtgaaaac cgaaagccct 120  
 10 tcaacttttt gcctatgcag attaatacta acaagagcaa ggatgctact gcaagtcttc 180  
 caaagagaga gatgacaacg tcagcacagt gcaaagagtt gtttgcttct gctctaagta 240  
 atgacctttt gcaaaaactgt caatctctga agaagatggg agagggggagc ctgcatggga 300  
 15 aacaccagat tgtaagcagg ctgtttcaat cctgactata ttactaaagc tagttctatg 360  
 cnanaagttt tgtaanaaaa atgaaagtct gcaatgttga 400

20 <210> 12

<211> 416

25 <212> DNA

<213> Mus musculus

30 <400> 12  
 tcttctagct ttgcagcata aagcagagca agctatnagc tgtgatggat gactctgttg 60  
 ttacagaaac tacaggaagc ttatctggag tcagcatcac atctgaacta aatgaagaac 120  
 35 tgaatgattt aattcagcgt ttccataatc agcttcgtga ttctcagcct ccagctgttc 180  
 cagacaacag aagacaggca gaaagtcttt cattaactag agagatttct cagagcagaa 240  
 atccctcagt ttctgaacat ttacctgatg agaaagtaca gcttttttagc aaaatgagag 300  
 40 tactacagga aaagaacaag aaatggacaa attagttggg agaacttcat aaccttcgag 360  
 atnagcatct gaacaactca tcatttgtgc cntcaacttc ncnccaaaga agtggg 416

45 <210> 13

<211> 484

<212> DNA

50 <213> Mus musculus

<400> 13  
 55 gtttctacac ctactgaaca gcagcagcca tttagctcaa aatcctlnca gggnaaaaca 60



gagtataatgg cttttccaaa accctctgna aagcagttct tctcttggag cagaaaagca 120  
 aaggaatcaa gaaacagccc gaagaggaag ctgaaaacac taagacacca tggttatatg 180  
 5 atcaagaagg tggagtagaa aaaccatitt tcaagactgg atttacagag tctgtagaga 240  
 aagntacaaa atagtanccg caaaaatcaa ccagatacaa gcaggagaag acgtcgggtt 300  
 10 gatgaagaat cccttggaaa gctttagcag tatgcctgat cctatagacc caacatcagt 360  
 aactaaaaca tttaaaca gaaaagcatc tgcccaggcc agcctggcct ctaaggacaa 420  
 aactcccaaa tcaaagagta agaagaggat tctactcagc tgaaaagtag agttaaaaat 480  
 15 attg 484

20 <210> 14

<211> 211

<212> DNA

25 <213> Mus musculus

30 <400> 12

ctgtctgtca ttgtcgttct cctttagaag gcagaaaaga aatgggaaga aaaaaggcaa 60  
 aatctggaac actataacgg aaaggagttc gagaagctcc tggaggaagc tcaggccaac 120  
 35 atcatgaagt caattccaaa cctggagatg cccccagctt ccagcccagt gtcaaaggga 180  
 gatgcggcag gggataagct ggagctgtca g 211

#### 40 Claims

1. A trap vector containing a *loxP* sequence composed of inverted repeat sequence 1, a spacer sequence and inverted repeat sequence 2 in this order, said *loxP* sequence being a mutant *loxP* wherein a part of said inverted repeat sequence 1 is mutated.
2. The trap vector of claim 1, wherein the mutant *loxP* is *lox71*.
3. The trap vector of claim 2, wherein *lox71* is as shown in SEQ ID NO: 1.
4. A trap vector containing a *loxP* sequence composed of inverted repeat sequence 1, a spacer sequence and inverted repeat sequence 2 in this order, said *loxP* sequence being a mutant *loxP* wherein a part of said inverted repeat sequence 2 is mutated.
5. The trap vector of claim 4, wherein the mutant *loxP* is *lox66*.
6. The trap vector of claim 5, wherein *lox66* is as shown in SEQ ID NO: 2.

7. A trap vector selected from the group consisting of the following (a) to (h):

- (a) SP-SA-*lox71*-IRES-M-*loxP*-PV-SP
- (b) SP-*lox71*-IRES-M-*loxP*-PV-SP
- (c) SA-*lox71*-IRES-M-*loxP*-pA-PV-SP
- (d) SA-*lox71*-IRES-M-*loxP-puro*-pA-PV-SP
- (e) *lox71*-M-*loxP*-pA-*lox2272*-PV-*lox511*
- (f) *lox71*-IRES-M-*loxP*-pA-*lox2272*-PV-*lox511*
- (g) (*lox71*-integrated SA)-M-*loxP*-pA-*lox2272*-PV-*lox511*
- (h) (*lox71*-integrated SA)-IRES-M-*loxP*-pA-*lox2272*-PV-*lox511*
- (i) (*lox71*-integrated SA)-M-*loxP*-pA-*lox2272*-promoter-M-*lox511*-SD,

wherein SP represents any sequence; SA represents a splice acceptor; SD represents a splice donor; IRES represents an internal ribosomal entry site; M represents a marker gene; *puro* represents ; pA represents a poly(A) sequence; and PV represents a plasmid vector.

8. The trap vector of claim 7, wherein the plasmid vector is any one selected from the group consisting of pBR, pUC, pSP and pGEM.

9. A vector generated from recombination between the trap vector of claim 1 and the trap vector of claim 4.

10. The vector of claim 9, wherein said vector does not undergo recombination with other *loxP*.

11. A method of gene trapping, comprising introducing the trap vector of any one of claims 1 to 8 into embryonic stem cells.

12. Embryonic stem cells into which the trap vector of any one of claims 1 to 8 is introduced.

13. A transgenic animal into which the trap vector of any one of claims 1 to 8 is introduced.

14. The transgenic animal of claim 13, wherein said animal is selected from the group consisting of mouse, rat, rabbit, guinea pig, pig, sheep and goat.

15. A method for producing a transgenic animal, comprising introducing the embryonic stem cells of claim 12 into an animal.

16. A knockout animal into which the trap vector of any one of claims 1 to 8 is introduced.

17. The knockout animal of claim 16, wherein said animal is selected from the group consisting of mouse, rat, rabbit, guinea pig, pig, sheep and goat.

18. A method for producing a knockout animal, comprising introducing the embryonic stem cells of claim 12 into an animal.

FIG. 1

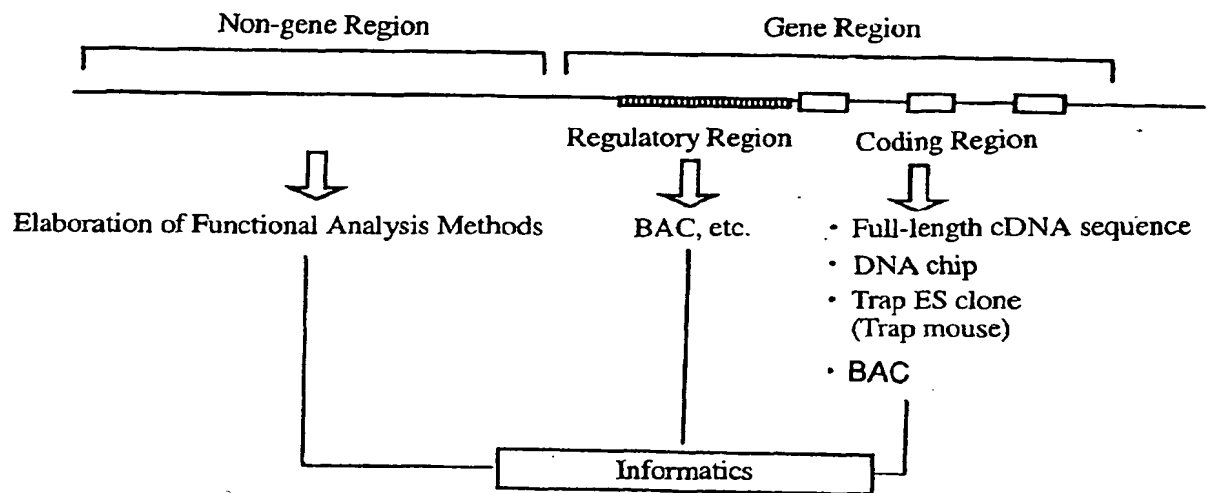


FIG. 2

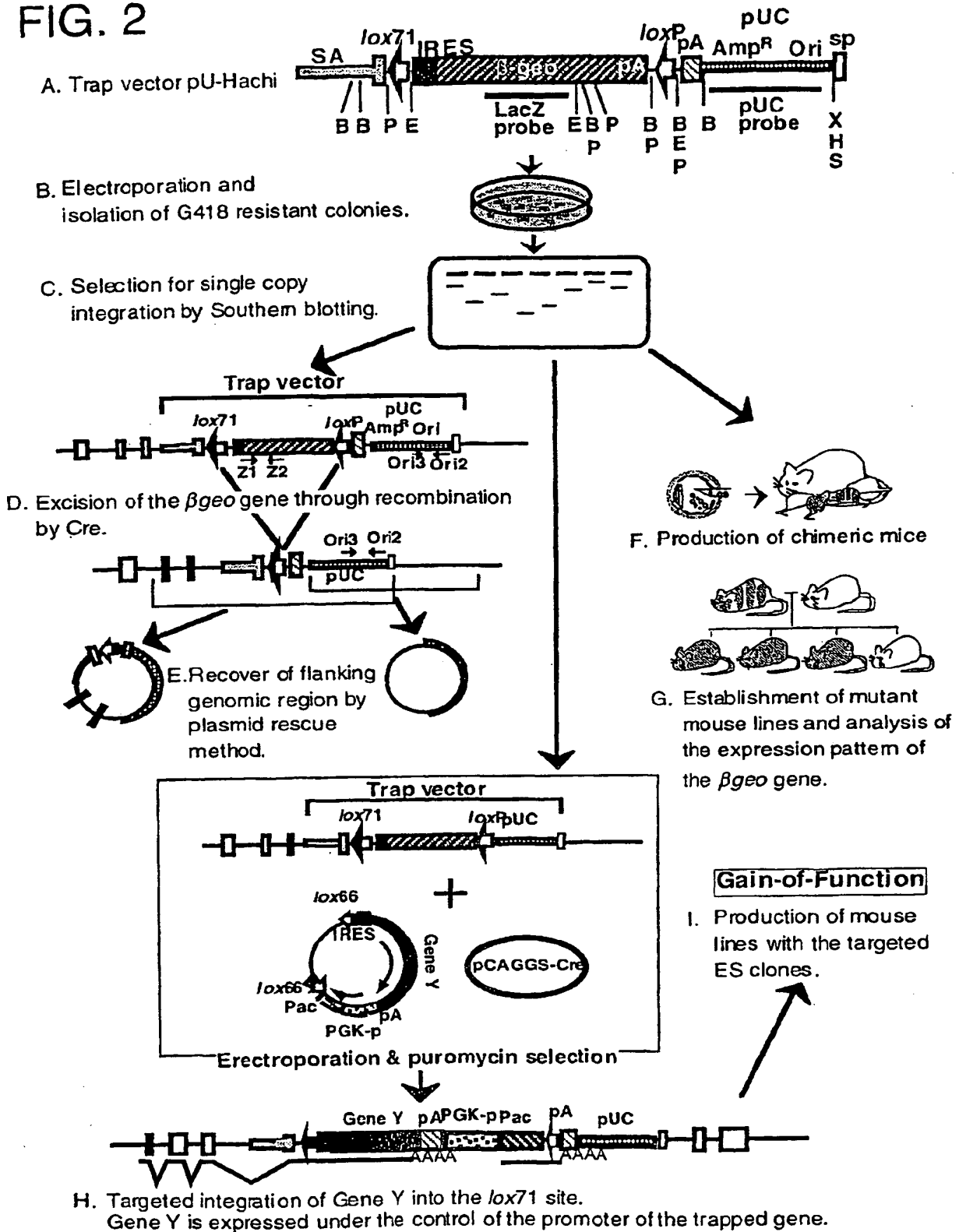


FIG. 3

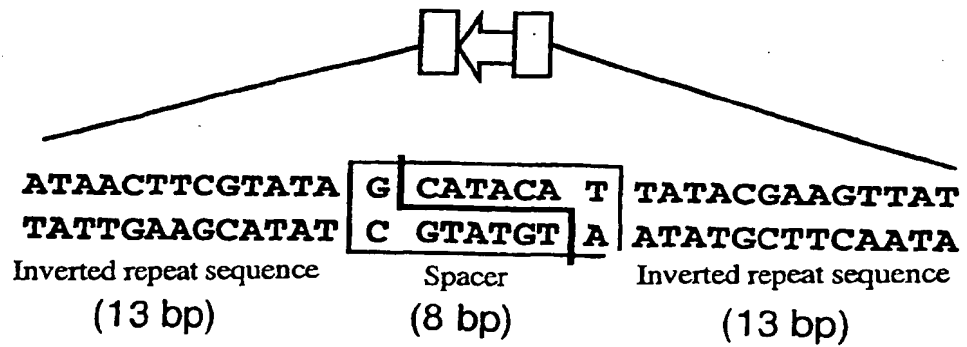


FIG. 4

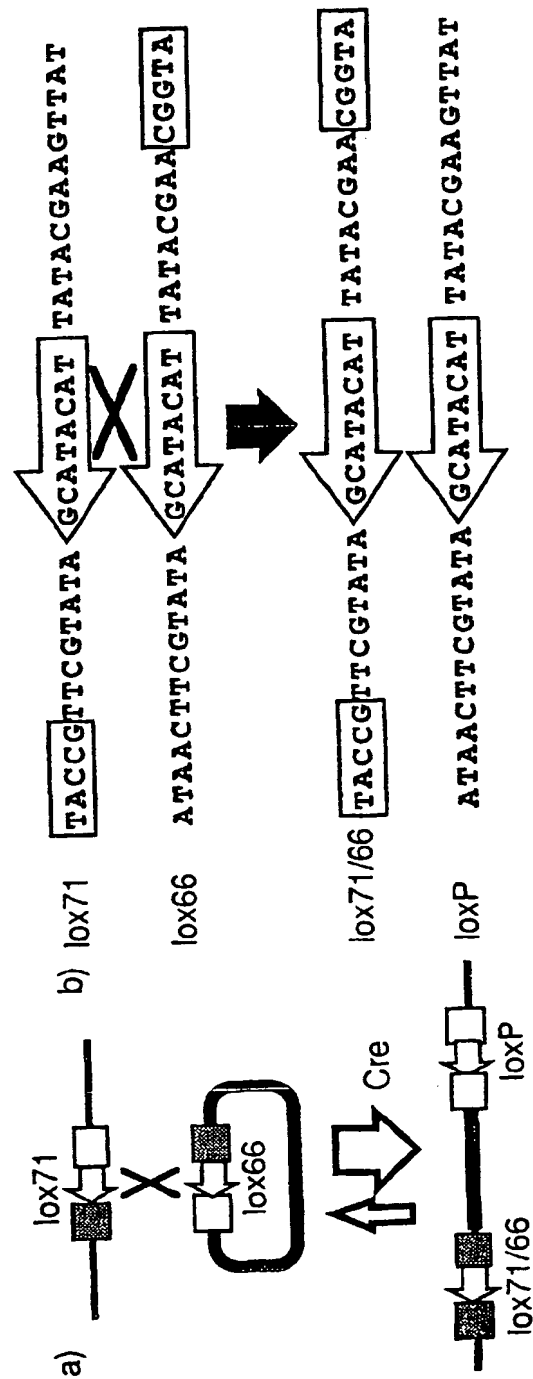


FIG. 5

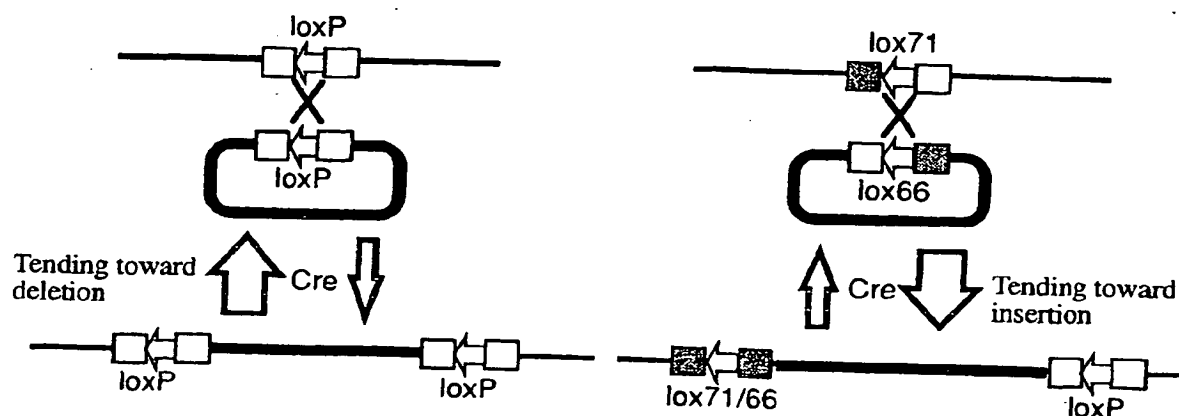


FIG. 6

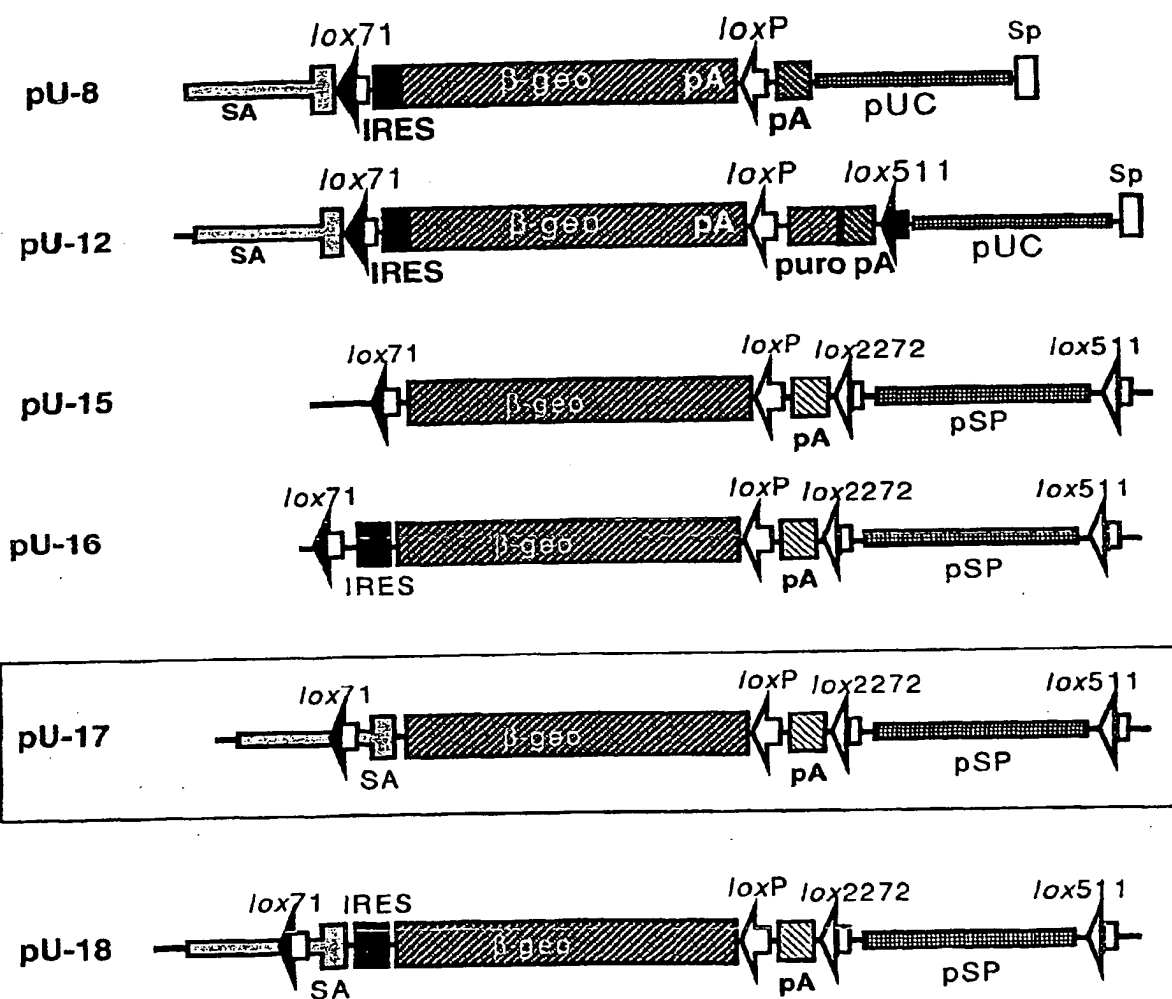




FIG. 7

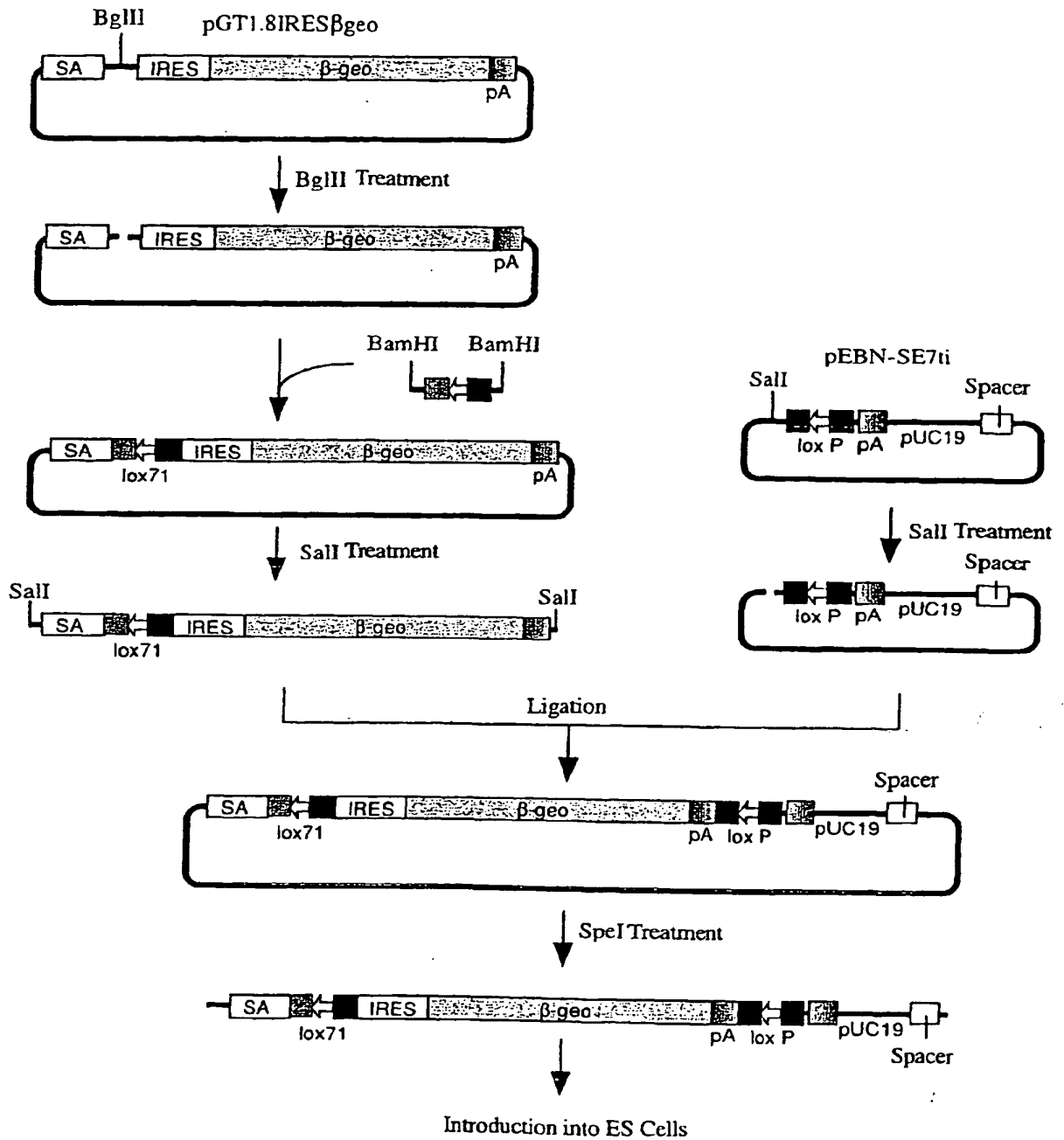


FIG. 8

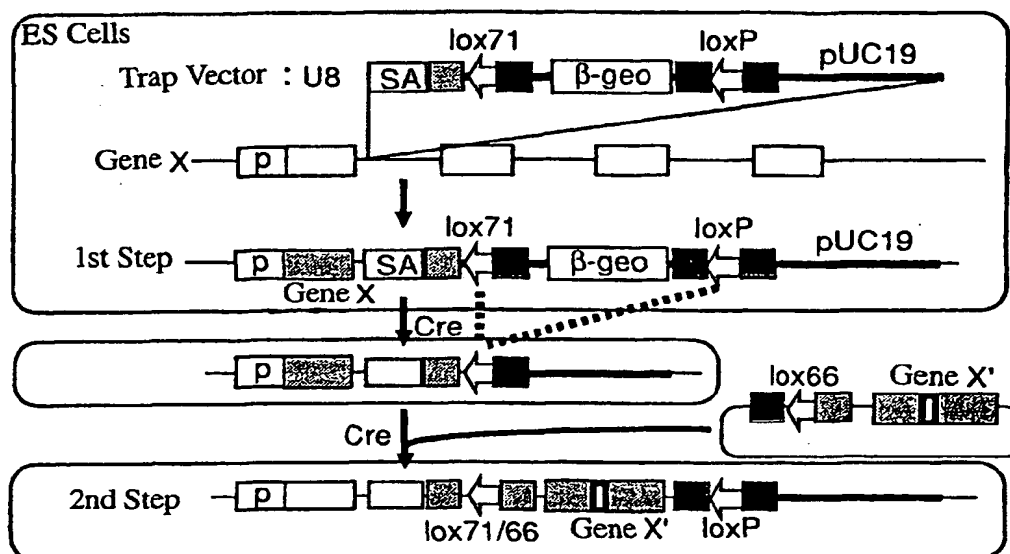


FIG. 9

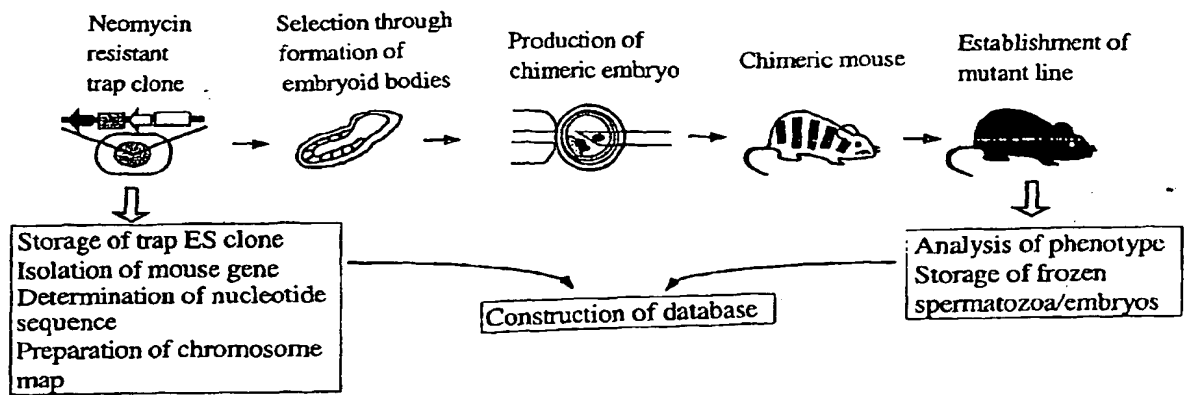


FIG. 10

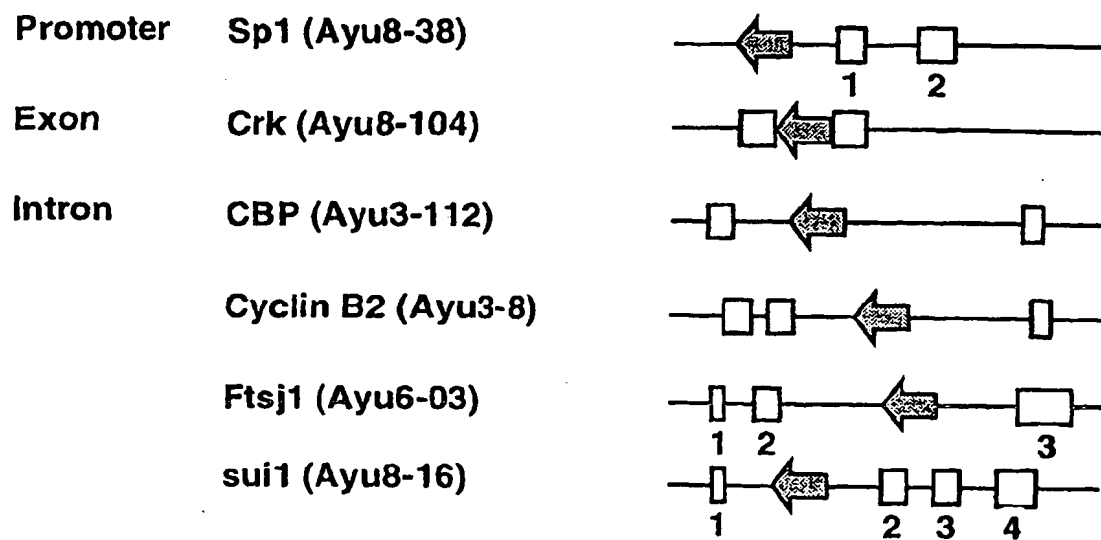
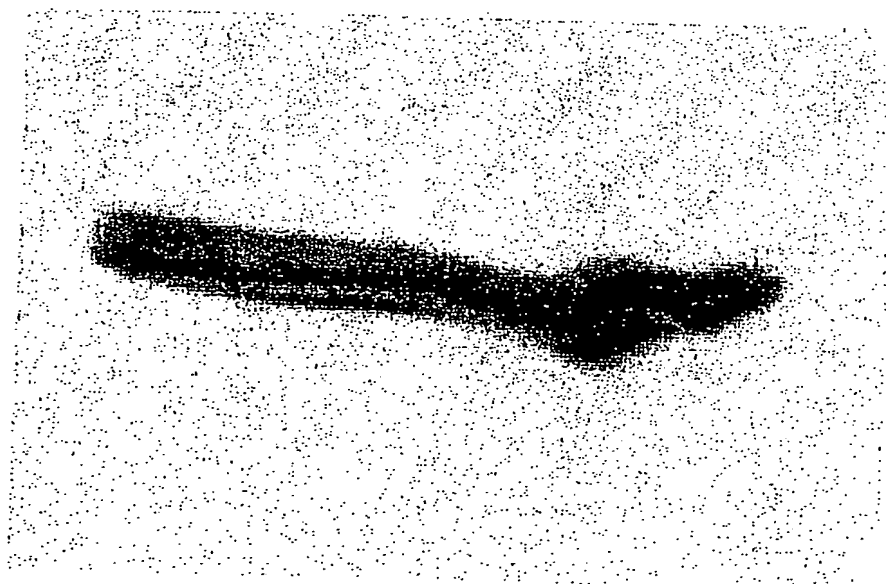
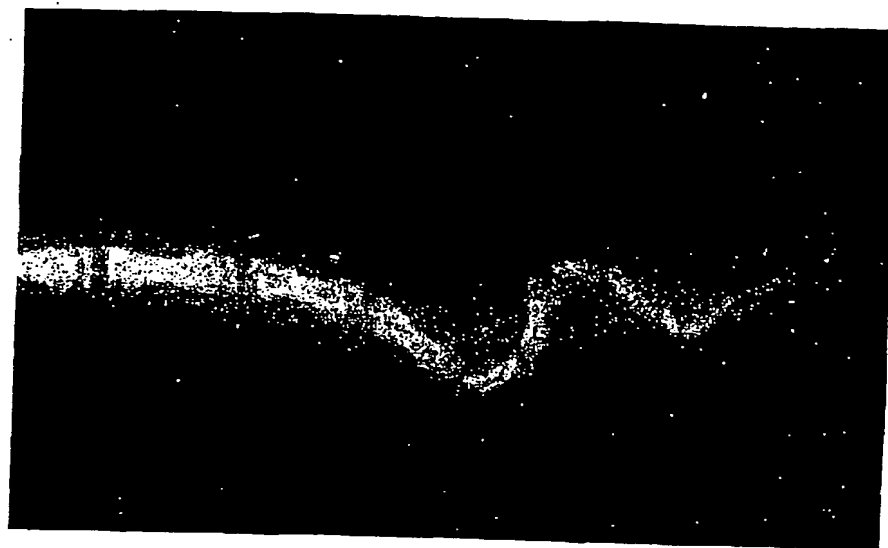


FIG. 11



Abnormality in the tail of Ayu8021

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02916

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/85, A01K 67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/85, A01K 67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GeneSeq/DBJ/GenBank/EMBL

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ARAKI K. et al., "Targeted integration of DNA using mutant lox sites in embryonic stem cells", Nucleic Acids Research (1997), Vol.25, No.4, pp.868-872	1-18
A	ARAKI K. et al., "Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: comparison of various promoters", Journal of Biochemistry (1997), Vol.122, No.5, pp.977-982	1-18
A	IRMGARD S. et al., "Selective disruption of genes transiently induced in differentiating mouse embryonic stem cells by using gene trap mutagenesis and site-specific recombination", Molecular and Cellular Biology (1998), Vol.18, No.5, pp.3081-3088	1-18
A	LI Z. et al., "Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells", Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America (1996), Vol.93, No.12, pp.6158-6162	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
21 June, 2000 (21.06.00)Date of mailing of the international search report  
04 July, 2000 (04.07.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)